

原 著

ラット気管におけるアデノシン受容体刺激薬の 血管透過性に対する影響について

山脇 功 玉置 淳 武田 祐子 永井 厚志

要旨：ラット気管の血管透過性に対するアデノシン及び各種受容体刺激薬の効果を *in vivo* で検討した。血管透過性は血管外に漏出した Evans blue の吸光度を測定することにより評価した。A₃ 受容体刺激薬である N⁶-2-(4-aminophenyl) ethyladenosine (APNEA) の吸入は気道の血管透過性を濃度依存的に増強させたが、アデノシンと A₁・A₂ 受容体刺激薬である [R]-N⁶-[1-Methyl-2-phenylethyl]adenosine (R-PIA), 5'-(N-ethyl-carboxamide) adenosine (NECA) は無効であった。カプサイシン吸入による血管透過性亢進はアデノシン, R-PIA, APNEA の前投与による影響を受けなかった。NECA の前投与はカプサイシン吸入による血管透過性亢進を用量依存的に抑制したが、サブスタンス P 吸入による透過性亢進には無効であった。したがって、A₃ 受容体を介した血管透過性亢進作用と、A₂ 受容体を介したタキキニン遊離抑制に基づく神経原性炎症の制御が示唆され、気道炎症におけるアデノシン受容体の関与が推察された。

キーワード：アデノシン, 気道炎症, 血管透過性, カプサイシン, 気管支喘息

Adenosine, Airway inflammation, Vascular permeability, Capsaicin, Asthma

緒 言

プリン誘導体であるアデノシンの吸入は喘息患者に気管支攣縮を惹起させる^{1,2)}。さらに、喘息発作時の血清³⁾や気管支肺胞洗浄液⁴⁾のアデノシン濃度の上昇が報告され、喘息の病態形成における関与が推測されている。アデノシンはラット皮膚⁵⁾やハムスター類粘膜⁶⁾の血管透過性を亢進させるが、気道の血管透過性に対する効果は不明である。また、アデノシンは A₁, A₂ (A_{2a}, A_{2b}), A₃ の大きく3つに分類される受容体を介してその作用を発現する^{7,8)}。本研究では、ラット気管の血管透過性に対するアデノシン及び各種受容体刺激薬の効果を検討した。A₁・A₂・A₃ 受容体刺激薬としては [R]-N⁶-(1-Methyl-2-phenylethyl) adenosine (R-PIA), 5'-(N-ethyl-carboxamide) adenosine (NECA), N⁶-2-(4-aminophenyl) ethyladenosine (APNEA) をそれぞれ使用した⁷⁾⁻⁹⁾。

一方、アデノシンは電気刺激により引き起こされた気管支平滑筋収縮を抑制し、その作用は神経伝達物質の遊離抑制であることが *in vitro* の実験において報告されている¹⁰⁾。これは、アデノシンが神経原性炎症の抑制作用を持つ可能性を示唆するものである。よって本研究では、カプサイシン吸入による神経原性の血管透過性亢進(神

経原性炎症)に対するアデノシンと各種受容体刺激薬の効果についても検討した。

方 法

血管透過性の測定：

Sprague-Dawley 系雄ラット (SPF, 体重 200 ~ 250 g) をペントバルビタール (40 mg/kg) にて腹腔内麻酔後、喉頭と上部気管を露出し喉頭直下で気管切開を行った。カニユーラを気管内に挿入し、レスピレータ (SN-480-7, シナノ製作所) に接続して人工換気を行った (呼吸回数: 70 回/分, 1 回換気量: 10 ml/kg)。気道粘膜の血管透過性の程度は、血管外に漏出した Evans blue の吸光度を測定することにより評価した。3% Evans blue (30 mg/kg, Sigma 社) を大腿静脈より 5 秒以上かけて注入後、各種薬剤を超音波ネブライザー (0.2 ml/分; Pulmo-Sonic model 25, De Vilbiss 社) を用いて 2 分間吸入させた。5 分後に開胸し左右心房を切開し、左心室から上行大動脈にカテーテルを挿入し、リン酸緩衝液 (pH 5) を 120 mmHg 圧で注入し全身を 2 分間灌流した。その後、気管を摘出し組織の湿重量を測定後、ホルムアミド中に 18 時間浸漬して血管外に漏出した Evans blue を抽出した。溶液中の Evans blue 濃度は分光光度計 (620 nm, Ultrospec Plus, Pharmacia LKB Biochrom 社) を用いて測定し、組織の湿重量 1 mg あたりの Evans blue 量を検量線から求めた。

実験プロトコール：

1. 血管透過性に対する効果

Evans blue 投与直後にアデノシン, R-PIA, NECA (それぞれ 10^2 M, Sigma 社) あるいは APNEA (3×10^5 - 10^2 M, 協和発酵) を 2 分間吸入させ, 5 分後に血管透過性を測定した. それぞれの薬剤の濃度は予備の実験により決定した. つまり, できるだけ濃い濃度で数例の効果測定し, 効果のあるものは低濃度でも検討した. アデノシンは生理食塩水で溶解し, R-PIA と NECA は 3% Dimethyl Sulfoxide (DMSO, ナカライテスク社) で溶解して 10^2 M の原液を, APNEA は 15% DMSO で溶解して 10^2 M の原液を作成後, 必要に応じてさらに生理食塩水で希釈した. コントロール群には 3% DMSO の吸入を行った.

2. 神経原性炎症に対する効果

神経原性炎症による血管透過性亢進の程度を検討するため, Evans blue 投与直後に 2 分間カプサイシン (10^6 - 3×10^4 M, Sigma 社) を吸入させ, 5 分後に透過性を測定し, 濃度 反応曲線を作成した. 次に, 神経原性炎症に対する各種薬剤の効果を検討するため, まずアデノシン, R-PIA, APNEA (それぞれ 100 nmol/kg) あるいは NECA (1~1000 nmol/kg) を経静脈的に投与し, 5 分後 Evans blue 投与直後にカプサイシン (3×10^5 M) あるいはサブスタンス P (10^4 M) を 2 分間吸入させ, さらに 5 分後に透過性を測定した. コントロール群には, 0.3% DMSO (1 ml/kg, iv) の投与を行った.

統計

すべてのデータは平均値 \pm 標準誤差で表記した. 統計学的解析には Scheffe's F-test を用い, $p < 0.05$ を有意差ありと判定した.

成 績

アデノシン, R-PIA, あるいは NECA (いずれも 10^2 M) の吸入によるそれぞれの気管での Evans blue 漏出量とコントロール (3% DMSO) 吸入による漏出量との間に有意差はみられなかった (Table 1). しかし, APNEA の吸入は 3×10^4 M 以上で気管での Evans blue 漏出量を濃度依存的に亢進させた (Fig. 1).

カプサイシンの吸入は 10^6 M 以上で気管での Evans blue 漏出量を濃度依存的に亢進させた (Fig. 2). カプサイシン (3×10^5 M) の吸入により惹起した Evans blue の漏出はアデノシン, R-PIA, APNEA (それぞれ 100 nmol/kg, iv) の前投与による影響を受けなかった. しかし, NECA はカプサイシン (3×10^5 M) の吸入により惹起した Evans blue の漏出を 10 nmol/kg 以上で用量依存的に抑制し (Fig. 3), 100 nmol/kg でその抑制率は 82% であった ($p < 0.01$, $n=6$, Table 2).

10^4 M のサブスタンス P 吸入は気管の Evans blue 漏

Table 1 Effects of adenosine, R-PIA and NECA on airway vascular leakage

	Evans blue dye (ng/mg tissue)
Control (3% DMSO)	19.4 \pm 2.7
Adenosine (10^2 M)	22.8 \pm 3.0
R-PIA (10^2 M)	18.4 \pm 3.2
NECA (10^2 M)	24.2 \pm 3.7

Values are means \pm SE, $n = 6$

Table 2 Effects of adenosine, R-PIA, NECA and APNEA on capsaicin-induced airway vascular leakage

	Evans blue dye (ng/mg tissue)
Control (0.3% DMSO, 1 ml/kg)	73.2 \pm 5.4
Adenosine (100 nmol/kg)	68.6 \pm 4.4
R-PIA (100 nmol/kg)	77.8 \pm 6.5
NECA (100 nmol/kg)	29.3 \pm 5.0**
APNEA (100 nmol/kg)	73.5 \pm 6.8

Values are mean \pm SE; $n = 6$

** $p < 0.01$, Significantly different from control value

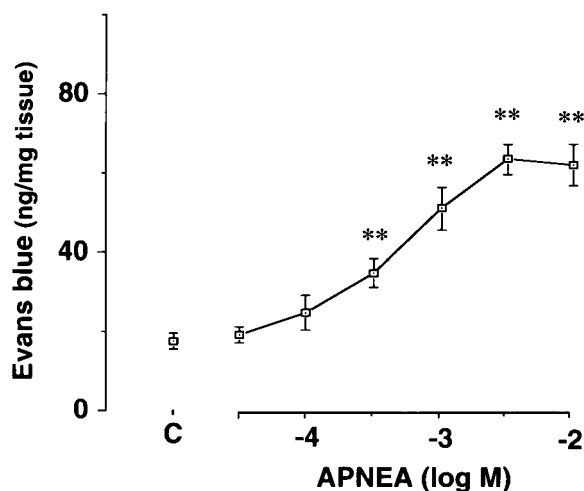


Fig. 1 Effects of various concentrations of inhaled APNEA on vascular extravasation in rat trachea. The aerosols were given for 2 min, and the rats received 3% DMSO as a control (C). Vascular extravasation was evaluated by measuring the amount of Evans blue dye extravasated in the tissues. Values are mean \pm SE; $n=6$ for each point.

** $p < 0.01$, significantly different from control value.

出量を亢進させ, その効果は 3×10^5 M のカプサイシン吸入と同程度であった. 高用量 NECA (1,000 nmol/kg) の前投与はサブスタンス P 吸入による Evans blue 漏出量を約 51% 抑制したが ($p < 0.01$, $n=6$), 低用量 (1~100 nmol/kg) では抑制効果を認めなかった (Fig. 4).

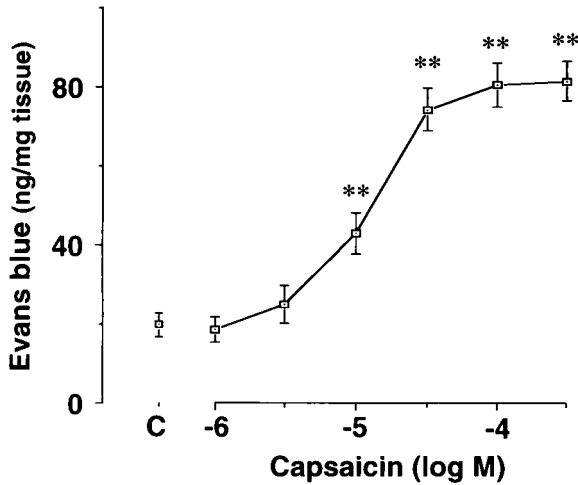


Fig. 2 Effects of various concentrations of inhaled capsaicin on vascular extravasation in rat trachea. The aerosols were given for 2 min, and the rats received 0.9% NaCl as a control (C). Vascular extravasation was evaluated by measuring the amounts of Evans blue dye extravasated in the tissues. Values are mean \pm SE; n=6 for each point.

**p<0.01, significantly different from control value.

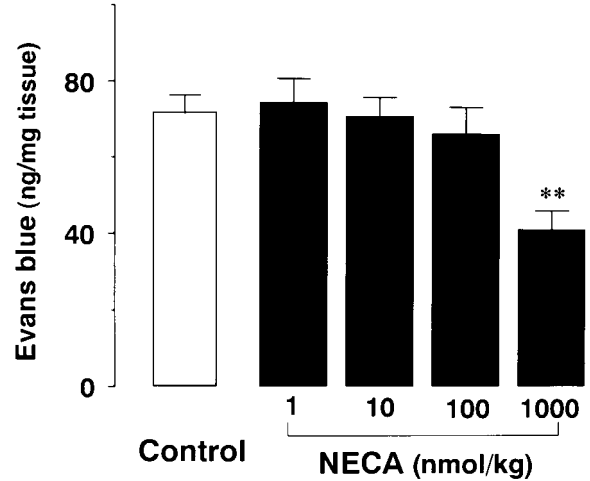


Fig. 4 Effects of pretreatment with different doses of intravenous NECA (closed columns) and 0.3% DMSO (1 ml/kg) alone (control ; open column) on Evans blue extravasation caused by inhalation of substance P (SP, 10^{-4} M). Values are mean \pm SE; n=6 for each point.

**p<0.01, significantly different from control value.

考 察

アデノシン受容体は従来 adenylate cyclase の抑制あるいは促進により A1 および A2 という2つの受容体サブタイプに分類されていたが、その後 A3 受容体の存在が明らかとなった⁷⁾⁻⁹⁾。気道の血管でのアデノシン各受容体の存在は不明であるが、哺乳類の肺での発現が報告されている¹¹⁾⁻¹³⁾。本実験で用いた APNEA は A3 受容体に高い親和性を持ち⁸⁾、A1/A2 受容体の拮抗薬である 8 (p-sulphophenyl) theophyllin により抑制されない A3 受容体を介した降圧作用⁹⁾や気管支攣縮作用¹⁴⁾を引き起こすことから、これまでも in vivo の実験で用いられている。本研究では、アデノシンと A1・A2 受容体刺激薬の吸入が気道の血管透過性に影響を与えず、A3 受容体刺激薬がこれを濃度依存的に亢進させることを示した。よって、おそらく気道の血管内皮細胞に存在する A3 受容体に直接働いて血管透過性を亢進させることが示唆された。しかし、in vitro の実験では A3 受容体の活性化が肥満細胞からのメディエーター遊離を促進させる¹⁵⁾ことから、肥満細胞から遊離したヒスタミン等が血管内皮細胞に働いて間接的に血管透過性を亢進させている可能性も考えられた。

カプサイシンの吸入はラット気道の血管透過性を濃度依存的に亢進させた。この作用は NK-1 受容体拮抗薬の前投与により消失することから、知覚神経 C 線維より遊離したサブスタンス P 等のタキキニンによる作用で

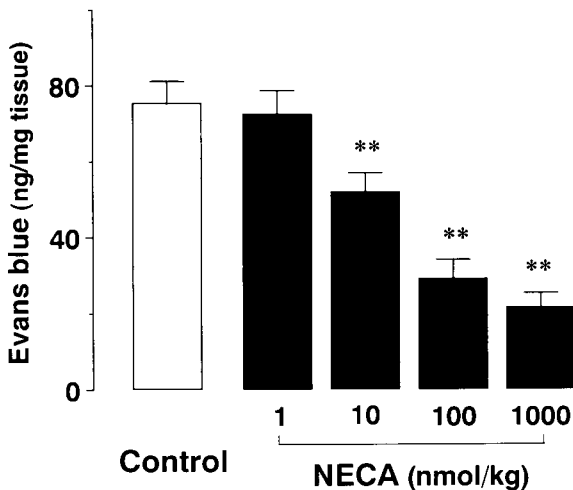


Fig. 3 Effects of pretreatment with different doses of intravenous NECA (closed columns) and 0.3% DMSO (1 ml/kg) alone (control ; open column) on Evans blue extravasation caused by inhalation of capsaicin (CAPS, 3×10^{-5} M). Values are mean \pm SE; n=6 for each point.

**p<0.01, significantly different from control value.

あると考えられている¹⁶⁾。本研究では、低用量の NECA (10~100 nmol/kg) がカプサイシン吸入による血管透過性を著明に抑制したが、サブスタンス P 吸入による透過性亢進に対しては無効であった。したがって、NECA は主に知覚神経 C 線維末端からのタキキニン遊離抑制を介して神経原性炎症を制御するものと考えられた。高用量の NECA (1,000 nmol/kg) がカプサイシン吸入のみならずサブスタンス P 吸入による血管透過性をも抑制した原因については不明である。

気道平滑筋を用いた *in vitro* の成績では、フォルスコリン、交感神経 β 2 刺激薬あるいはプロスタグランジン E 1 の外因性投与がタキキニンによる気管支収縮に影響を与えず、非アドレナリン非コリン作動性興奮神経による気管支収縮を著明に抑制することが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。上記薬剤がいずれも細胞内 cAMP を増加させることから勘案して、cAMP の増加による知覚神経 C 線維からの神経ペプチドの遊離抑制による機序が推察されている。A 2 受容体刺激薬も GTP 結合蛋白の Gs と結合することにより adenylate cyclase を活性化し細胞内 cAMP を増加させる⁷⁾⁸⁾ことから、同様の機序による血管透過性抑制効果が推測される。

今回の研究から、A 3 受容体の刺激による血管透過性亢進と A 2 受容体の刺激による神経原性炎症の抑制効果が明らかとなった。気道の血管透過性は喘息病態の重要な因子の一つであり、気道浮腫、気道上皮傷害、気道閉塞等が惹起される¹⁹⁾。アデノシン受容体を介した気道の血管透過性調節が喘息の病態形成に関与している可能性が示唆された。

本研究の一部は、杏林大学医学部平成 9 年度研究助成金によりおこなわれた。

引用文献

- 1) Cushley MJ, Tattersfield AE, Holgate ST: Adenosine-induced bronchoconstriction in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1984; 129: 380-384.
- 2) Holgate ST, Cushley MJ, Rafferty P, et al: The bronchoconstrictor activity of adenosine in asthma. In: Gerlach E, Becker BF, eds, *Topics and Perspective in Adenosine Research*, Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 1987; 614-624.
- 3) Mann JS, Holgate ST, Renwick AG, et al: Airway effects of purine nucleosides and nucleotides and release with bronchial provocation in asthma. *J Appl Physiol* 1986; 61: 1667-1676.
- 4) Driver AG, Kukoly CA, Ali S, et al: Adenosine in bronchoalveolar lavage fluid in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 148: 91-97.
- 5) Sugio K, Daly JW: Effect of forskolin on alterations

- of vascular permeability induced with bradykinin, prostaglandin E 1, adenosine, histamine, and carrageenin in rats. *Life Sci* 1983; 33: 65-73.
- 6) Gawlowski DM, Duran WN: Dose-related effects of adenosine and bradykinin on microvascular permselectivity to macromolecules in the hamster cheek pouch. *Circ Res* 1986; 58: 348-355.
- 7) Bruns RF, Lu GH, Pugsley TA: Adenosine receptor subtypes: binding studies. In: Gerlach E, Becker BF, eds, *Topics and Perspective in Adenosine Research*, Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 1987; 59-73.
- 8) Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, et al: Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 143-156.
- 9) Fozard JR, Carruthers AM: Adenosine A 3 receptors mediate hypotension in the angiotensin II-supported circulation of the pithed rat. *Br J Pharmacol* 1993; 109: 3-5.
- 10) Kamikawa Y, Shimo Y: Adenosine selectively inhibits noncholinergic transmission in guinea pig bronchi. *J Appl Physiol* 1989; 66: 2084-2091.
- 11) Ren H, Stiles GL: Posttranscriptional mRNA processing as a mechanism for regulation of human A 1 receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4864-4866.
- 12) Yakel JL, Warren RA, Reppert SM, et al: Functional expression of adenosine A 2 b receptor in xenopus oocytes. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 277-281.
- 13) Linden J, Taylor HE, Robeva AS, et al: Molecular cloning and functional expression of a sheep A 3 adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 524-530.
- 14) Meade CJ, Mierau J, Leon I, et al: *In vivo* role of the adenosine A 3 receptor: N⁶-2-(4-aminophenyl) ethyladenosine induces bronchospasm in RDE rats by a neurally mediated mechanism involving cells resembling mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279: 1148-1156.
- 15) Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, et al: The A 3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 16887-16890.
- 16) Eglezos A, Giuliani S, Viti G, et al: Direct evidence that capsaicin-induced plasma protein extravasation is mediated through tachykinin NK 1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1991; 209: 277-279.
- 17) Aikawa T, Sekizawa K, Itabashi S, et al: Inhibitory actions of prostaglandin E 1 on non-adrenergic noncholinergic contraction in guinea-pig bronchi. *Br J*

- Pharmacol 1990; 101: 13-14.
- 18) Aikawa T, Sekizawa K, Morikawa M, et al: The role of cyclic AMP in non-adrenergic non-cholinergic contraction in guinea-pig bronchi. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 609-612.
- 19) Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ, et al: The role of increased airway microvascular permeability and plasma exudation in asthma. *Eur Respir J* 1990; 3: 329-337.

Abstract

Effect of Adenosine and its Analogues on Microvascular Leakage in the Rat Trachea

Isao Yamawaki, Jun Tamaoki, Yuko Takeda and Atsushi Nagai

First Department of Medicine, Tokyo Women's Medical College, Tokyo 162-0054, Japan

We examined the effects of adenosine and its analogues on vascular permeability in rat trachea using Evans blue dye as a marker for plasma leakage. Inhalation of N⁶-2-(4-aminophenyl) ethyladenosine (APNEA), a specific A₃ receptor agonist, increased microvascular leakage in a dose-dependent manner, but adenosine, [R]-N⁶-(1-Methyl-2-phenylethyl) adenosine (R-PIA), a specific A₁ receptor agonist, and 5'-N-ethyl-carboxamide adenosine (NECA), a specific A₂ receptor agonist, had no effect. Inhalation of capsaicin increased vascular permeability in a dose-dependent manner. Pretreatment with NECA (10-1000 nmol/kg, i.v.) but not adenosine (100 nmol/kg, i.v.), R-PIA (100 nmol/kg, i.v.) or APNEA (100 nmol/kg, i.v.) inhibited microvascular leakage produced by capsaicin aerosol (3 × 10⁻⁵M) in a dose-dependent manner. However, NECA (10-100 nmol/kg, i.v.) failed to inhibit substance P aerosol (10⁻⁴M)-induced extravasation of the dye. These findings suggest that stimulation of adenosine A₃ receptors produces airway vascular permeability, and that A₂ receptors inhibit neurogenic plasma extravasation, presumably by inhibiting the release of tachykinins from sensory nerves.