

糖尿病時および高血圧症時における
血管平滑筋の薬物感受性変化
(—血管内皮細胞障害と関連して—)

宮 田 則 之

目次

要約	1
緒言	6
第1章 Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における α -adrenaline 受容体介在性血管収縮反応の亢進と Ca^{2+} -channel の機能変化	9
実験方法	10
実験結果	13
考察	22
第2章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体 作動薬に対する弛緩反応の減弱	24
実験方法	25
実験結果	28
考察	37
第3章 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体 作動薬に対する弛緩反応の減弱	39
実験方法	40
実験結果	42
考察	45
第4章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞依存性 弛緩反応の減弱と血管中 cyclic nucleotide 量の変化	47
実験方法	48
実験結果	51

考察	55
第5章 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞依存性 弛緩反応に及ぼす加齢および血糖値の影響	57
実験方法	58
実験結果	61
考察	68
第6章 自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈における血管内皮細胞依存性 弛緩反応の減弱	70
実験方法	71
実験結果	73
考察	76
第7章 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の頸動脈における 血管内皮細胞依存性弛緩反応および血管中 cyclic GMP 量の変化	77
実験方法	78
実験結果	81
考察	87
第8章 SHRSP の門脈平滑筋における protein kinase C 介在性血管収縮 反応	89
実験方法	90
実験結果	92
考察	95

第9章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ATP-sensitive	
K ⁺ -channel の機能変化	96
実験方法	97
実験結果	99
考察	102
第10章 SHRSP の頸動脈における ATP-sensitive K ⁺ -channel の機能変化	103
実験方法	104
実験結果	106
考察	108
第11章 Cyclic GMP 増加薬の α -adrenaline 受容体介在性血管収縮抑制	
作用	109
実験方法	110
実験結果	114
考察	125
第12章 β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応の cyclic GMP 増加薬	
による増強作用と血管中 cyclic nucleotide 量の変化	127
実験方法	128
実験結果	131
考察	140
第13章 Protein kinase C 介在性血管収縮作用に及ぼす cyclic GMP 増加薬	
の影響	142
実験方法	143

実験結果	145
考察	150
総括	151
謝辞	158
掲載雑誌目録	160
参考文献	163

要約

糖尿病および高血圧症は、脳血管疾患、虚血性心疾患、動脈硬化症、腎症等の循環器系の合併症をしばしば伴うことが知られている。そこで、実験的糖尿病動物および自然発症高血圧動物より、血管平滑筋を摘出し、種々生理活性物質に対する薬物感受性変化を検討した。

1) Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットを作製し、胸部大動脈における norepinephrine (NE) 誘発血管収縮作用を対照群と比較検討した。NE による α -adrenaline 受容体介在性血管収縮作用は、糖尿病群において亢進していることが明らかとなった。また、 Ca^{2+} -free 下 NE 誘発一過性収縮は糖尿病群において反応性の増大が認められたが、その後の、 Ca^{2+} 収縮には、両者の間に差は認められなかった。さらに、 Ca^{2+} -free 下の K 脱分極筋における Ca^{2+} 収縮および Bay K 8644 (電位依存性 Ca^{2+} channel agonist) 誘発血管収縮反応も糖尿病群で有意な反応性の増大が認められた。以上のことから I 型糖尿病のモデルである STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における NE による収縮反応の反応性増大には、電位依存性 Ca^{2+} channel の活性化および phosphatidylinositol 代謝回転の亢進が関与していることが明らかとなった。

2) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における isoproterenol (ISO) による血管弛緩反応を、対照群と比較検討した。糖尿病時の血管反応性を検討する前に ISO による血管弛緩作用に及ぼす内皮細胞の影響を検討した。その結果、内皮細胞存在時には、非存在時と比較して、ISO の血管弛緩作用が強く惹起され、ISO による弛緩反応が血管内皮細胞に一部依存していることが明らかとなった。ISO による β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応は、血管内皮細胞の有無に関わらず、糖尿病群において著明に減弱していた。しかし、血管平滑筋の adenylate cyclase 直接活性化薬である forskolin による血管弛緩反応は、両群の間に有意な差は認められなかった。以上の結果から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における cyclic AMP 系において、 β -adrenaline 受容体の受容体数または親和性の低下が示唆された。

3) 自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットを用い同様の検討を行なったところ、STZ 誘発糖尿病ラットと全く同様に、糖尿病群において血管内皮の有無に関わらず ISO 誘発血管弛緩反応の減弱が認められた。以上の結果から、糖尿病時における β -adrenaline 受容体の機能は、化学物質誘発糖尿病モデルおよび自然発症糖尿病モデルのいずれの I 型糖尿病モデルにおいても低下してい

ることが明らかとなった。

4) 糖尿病時における血管内皮細胞機能を検討する目的で、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における acetylcholine (ACh) 誘発内皮細胞依存性血管弛緩反応を対照群と比較検討した。ACh による血管弛緩反応の感受性は糖尿病群において有意に低下していた。しかし、内皮細胞非依存性である sodium nitroprusside (SNP, soluble guanylate cyclase activator) および atrial natriuretic peptide (心房性ナトリウム利尿ペプチド, ANP, particulate guanylate cyclase activator) による血管弛緩反応には、有意な差は認められなかった。また、ACh による血管中 cyclic GMP の生成量を測定したところ、血管弛緩反応と同様に糖尿病群において有意な cyclic GMP 生成量の低下が認められた。以上のことから、STZ 誘発糖尿病ラットにおける血管内皮細胞の機能低下が示唆された。

5) 自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットにおいても、血管内皮細胞機能に関する検討を行なった。実験には、若齢 WBN/Kob ラット (10-13 週齢、糖尿病発症以前) および、高齢 WBN/Kob (90-92 週齢、糖尿病発症後) を用い、対照群には、WBN/Kob ラットの起源系統である同週齢の Wistar ラットを用いた。若齢および高齢糖尿病群における ACh 誘発血管弛緩反応は、それぞれ同週齢の対照群と比較すると有意に減弱していたが、この減弱は、とりわけ高齢糖尿病群で顕著であった。また、糖尿病群および対照群は、いずれも加齢に伴い ACh による血管弛緩反応は減弱していた。一方、SNP および ANP による血管弛緩反応もいずれの群においても差は認められなかった。また、各々の群における血管内皮細胞の電子顕微鏡写真を撮影したところ、若齢群には、異常は認められなかったが、高齢群において内皮細胞の組織学的障害が認められた。以上のことから、STZ 誘発糖尿病ラットと同様に自然発症糖尿病ラットにおいても血管内皮細胞障害が起こることが確認された。また、糖尿病発症以前の WBN/Kob ラットにおいても、血管内皮細胞機能障害が認められたことから、その血管内皮細胞機能は、血糖値に依存せず、遺伝的に低下している可能性が示唆された。

6) 糖尿病時における細動脈の血管内皮機能も検討する目的で、WBN/Kob ラットの上腸間膜動脈における ACh 誘発内皮細胞依存性血管弛緩反応を対照群と比較検討した。ACh による血管弛緩反応の感受性は糖尿病群において有意に低下していた。また、内皮細胞非依存性弛緩薬である SNP による血管弛緩反応には、有意な差は認められなかった。以上のことから、糖尿病時には、胸部大動脈だけではなく、より管腔の細い動脈においても、血管内皮機能が低下していることが明らかとなった。

7) 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の頸動脈においても同様に血管内皮細胞機能

に関して、対照群である Wistar-Kyoto ラット(WKY)と比較検討した。その結果、SHRSP の頸動脈において、ACh による血管弛緩反応の減弱が認められた。さらに、ACh と同様の内皮細胞依存性血管弛緩反応を有する A 23187 (Ca^{2+} ionophore) および melittin (ハチ毒)においても同様に、SHRSP において血管弛緩反応の減弱が認められた。一方、内皮細胞非依存性弛緩薬である SNP および cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP による血管弛緩反応は、両群の間に有意な差は認められなかった。さらに、ACh による血管中 cyclic GMP の生成量を測定したところ、血管弛緩反応と同様に SHRSP において有意な cyclic GMP 生成量の低下が認められた。以上のことから、高血圧症時には、血管内皮細胞の機能が特異的に障害され、このことは、血管内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF(NO)) の産生低下に起因することが明らかとなった。以上のことから、血管内皮細胞機能は、糖尿病時および高血圧症時いずれの病態においても、障害されていることが明らかとなった。血管内皮細胞機能の低下が起こると、血管中 cyclic GMP 量が低下するため、結果として、血管緊張の増大、血小板凝集、粘着、平滑筋増殖等が引き起こされるため、このことが、糖尿病時および高血圧症時に、動脈硬化症、脳血管疾患、虚血性心疾患、腎症などの合併症を高頻度に併発する原因とも考えられる。

8) 近年、血管平滑筋における phosphatidylinositol (PI) 代謝回転の血管収縮への関与が注目されている。そこで、PI 代謝回転における protein kinase C の役割に注目して、高血圧症ラットの血管平滑筋における protein kinase C 介在性血管収縮作用を検討した。実験には、SHRSP より摘出した門脈平滑筋を用い、対照群である WKY と比較検討した。その結果、phorbol dibutyrate (PDBu, protein kinase C activator) による血管収縮の反応性は、SHRSP 群において有意に増強していた。また、SHRSP より摘出した門脈平滑筋に、staurosporine (protein kinase C inhibitor) を前処置した後の PDBu 誘発血管収縮反応は、対照群と同様であった。以上の結果より、高血圧症時の血管平滑筋における protein kinase C の活性化が示唆され、このことが種々薬物に対する血管の反応性変化に関与している可能性が示唆された。

9) 血管平滑筋における ATP-sensitive K^+ -channel は、 K^+ イオンの透過性を変化させ、血管平滑筋の膜電位を調節していることから、二次的に voltage-dependent Ca^{2+} -channel (VDC) の活性を調節していることが知られている。そこで、糖尿病ラットおよび高血圧症ラットの血管平滑筋における種々 K^+ -channel 活性化薬および遮断薬に対する作用を比較検討した。その結果、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては、 K^+ -channel 活性化薬である cromakalim による血管弛緩反

応は著明に減弱していた。また、methylene blue (guanylate cyclase inhibitor) 存在下における nicorandil (cyclic GMP 増加作用を有する K⁺-channel 活性化薬) の血管弛緩反応も同様に減弱していたことから、糖尿病時の血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の活性は低下していることが示唆された。

10) SHRSP の頸動脈においても、同様の検討を行ない、対照群である WKY と比較検討した。その結果、cromakalim による血管弛緩反応は、SHRSP において、著明な反応性の増強が認められ、糖尿病時とは異なる結果であった。また、SHRSP より摘出した頸動脈に、glibenclamide (ATP-sensitive K⁺-channel 阻害薬) を前処置した後の cromakalim 誘発血管弛緩反応は、対照群と同様であった。以上の結果より、高血圧症時の血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel 活性の増大が示唆された。

Cyclic GMP は、血管弛緩反応作用、血小板凝集阻害作用、平滑筋増殖阻害作用を有することで知られている。Cyclic GMP 増加作用を有する代表的な薬物としては、nitroglycerin が知られている。一方、CD-349 は、dihydropyridine 系の Ca 拮抗薬であるが、構造式中にニトロ基を有することから、nitroglycerin と同様に cyclic GMP 増加作用を持つ化合物である。そこで、前述した病態動物の血管平滑筋における種々薬物感受性変化を考慮し、cyclic GMP 増加薬の血管弛緩機序を検討した。

11) 糖尿病時には、NE 誘発血管収縮が亢進していることをすでに示した。さらに、高血圧症時には交感神経の緊張が異常に高まり、その結果生ずる末梢血管抵抗の増大が、血圧上昇を引き起こすと考えられている。そこで、交感神経の神経伝達物質である NE 誘発収縮に対する cyclic GMP 増加薬の影響を検討した。CD-349 は、nitroglycerin および ANP などの cyclic GMP 増加薬と同様にウサギ摘出胸部大動脈において、NE 誘発血管収縮を濃度依存的に抑制した。また、CD-349 は、Ca²⁺-free 下の NE 誘発一過性収縮も濃度依存的に抑制し、さらにそれに引き続く Ca 収縮も濃度依存的に抑制した。これらの作用は、cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP と同様の結果であった。しかし、これらの NE 収縮抑制作用は、他の Ca 拮抗薬には認められない作用であった。さらに、CD-349 は、ウサギ胸部大動脈において濃度依存的に血管中 cyclic GMP 量を増加させ、これらの現象は、ラット胸部大動脈においても同様に認められた。以上のことから、cyclic GMP 増加薬は、NE 誘発収縮を抑制することが明らかとなった。また、これらの収縮抑制の作用機序には、PI 代謝回転の抑制および、receptor-operated Ca²⁺-channel の抑制作用が寄与し

ていることが示唆された。先に、4-7)において糖尿病時および高血圧症時には、血管内皮細胞の機能が低下し、EDRF (NO) の産生が減少することから血管中 cyclic GMP が減少することが明らかとなった。従って、これらの cyclic GMP 増加薬は、病態時に減少した血管中 cyclic GMP を補うことから、病態時の種々循環器系合併症に対しても、有用となる可能性が示唆された。

12) 糖尿病時には、ISO 誘発血管弛緩反応が减弱していることをすでに示した。さらに、高血圧症時においても、 β -adrenaline 受容体の機能が低下することが報告されている。末梢血管における β アドレナリン受容体は、血管弛緩性に働いていることから、 β -adrenaline 受容体の機能が低下することにより、末梢抵抗が増大し、血圧上昇または末梢循環障害を引き起こすことも考えられている。そこで、cyclic GMP 増加薬と β -adrenaline 受容体介在性弛緩反応との相互作用について検討した。ISO は、endothelin-1 で収縮させたウサギ胸部大動脈を濃度依存的に弛緩させた。その際に、nitroglycerin, ANP および CD-349 を、それぞれ前処置すると、ISO による弛緩作用は濃度依存的に増強された。この増強作用は、cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP でも同様の結果が得られた。また、この時、ISO による血管中 cyclic AMP 生成量を測定したところ、CD-349 および 8-Br-cyclic GMP によって、その生成量は増大した。以上のことから、cyclic GMP による cyclic AMP の弛緩作用および生成量の増強作用が認められた。この増強作用は、cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase 阻害作用に起因していることが示唆され、cyclic GMP 増加薬が、病態時における β -adrenaline 受容体の機能低下を改善する可能性が示唆された。

13) SHRSF の血管平滑筋における PDBu 誘発血管収縮作用を検討した結果、高血圧症時には、血管平滑筋における protein kinase C 活性が上昇しており、これが血管収縮の反応性変化に関与していることを、すでに示した。そこで、protein kinase C 介在性血管収縮作用に対する cyclic GMP 増加薬の影響を検討した。Nitroglycerin, ANP および CD-349 は、ウサギ胸部大動脈における PDBu 誘発収縮を濃度依存的に抑制し、これらの抑制作用は methylene blue により拮抗されたことから、cyclic GMP 増加作用に基づいていることが明らかとなった。また、これらの作用は、通常の Ca 拮抗薬には認められない作用であった。以上のことから、cyclic GMP 増加薬は、高血圧病態に活性化されている protein kinase C 介在性の血管収縮に対しても抑制作用を示すことが明らかとなった。

緒言

近年、糖尿病患者は急速に増加し、日本国内での患者数は 1993 年現在で、約 300 万人と推定されている。かつては、欧米と比較すると、その患者は少なかったが、近年、日本でも食生活の変化や未だ例のない急速な高齢化に伴い、増加の一途をたどっている。糖尿病とは、1985 年の WHO の定義¹⁾によると、「糖尿病は未治療時には、持続的な高血糖を呈する疾患である。高血糖等の代謝異常は、インスリン産生または作用の不足に基づくものである。糖尿病状態の持続によって、特異的な合併症が発症、進行し、動脈硬化症を促進する疾患である」とされている。糖尿病は、インスリン依存型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM) および非インスリン依存型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) の 2 種類に分類される²⁾。IDDM は、別名、若年性糖尿病とも呼ばれ、幼少の頃発症する 경우가多いが、全体的にみると、糖尿病患者全体の約 10 % を占めている。その原因は、未だ明らかとなっていないが、膵臓のランゲルハンス島に存在する β 細胞が免疫学的に破壊され、絶対的なインスリン不足を起こした結果、発症すると考えられ、临床上は、代謝異常により、ケトン体が血中に生成されることから、ケトアシドーシスを呈する特徴がある。一方、NIDDM は、成人以後に発症する 경우가多く、糖尿病患者全体の約 90 % を占める。一般に、NIDDM 患者では、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌は、保たれているが、末梢組織におけるインスリン感受性が低下しているため、結果として、相対的なインスリン不足を呈する。従って、インスリンによる治療は余り有効ではないとされている³⁾。

糖尿病は、種々の合併症を引き起こすことでも知られ、その合併症は極めて多彩である。糖尿病性合併症としては、大血管障害に起因する動脈硬化症^{4,5)}、脳血管疾患⁶⁻⁸⁾、虚血性心疾患⁹⁻¹¹⁾、また、微小血管障害に起因する網膜症、腎症¹²⁾等が挙げられるが、これらの合併症以外にも、神経障害、起立性低血圧、白内障、インポテンツ等様々である。特に、糖尿病時には、脂質代謝異常、ポリオール代謝異常、血液凝固系異常を起こすことから、動脈硬化症を高頻度に合併するが^{4,5)}、その発症原因は未だ解明されていない。

高血圧症は、1989 年の WHO および 国際高血圧学会の規定では、収縮期血圧が 160 mmHg 以上、拡張期血圧が 95 mmHg 以上とされている。高血圧症は、本態性、腎性、肺性、妊娠性等の要因で発症するが、現在高血圧症患者の大半を占めているのは本態性高血圧症である。本態性高血圧症は、

遺伝的な要因がかなり関与しているが、その原因遺伝子は多様であるため、未だ特定されていない。高血圧症も、糖尿病と同様に、脳血管疾患、虚血性心疾患等の重篤な合併症を、高頻度に合併することが知られている。従って、高血圧患者における降圧療法は、血圧を正常にコントロールすることによって合併症への移行を阻止することを目的としている。また、原因は不明であるが糖尿病時には高血圧症をしばしば伴うことも知られており^{13,14)}、今後の研究の進展が望まれている。

Cyclic GMP は、血管拡張作用、血小板凝集・粘着阻害作用、平滑筋増殖阻害作用を有することで知られている¹⁵⁻¹⁷⁾。Cyclic GMP 増加作用を有する代表的な薬物としては、古くから狭心症治療薬である nitroglycerin が知られている。Nitroglycerin は、冠血管拡張作用および静脈拡張作用を有していることから、抗狭心症薬として繁用されており、現在でも臨床の場では不可欠な薬物である。この nitroglycerin に加えて近年では、生体内物質である atrial natriuretic peptide も同様に、cyclic GMP を増加させることが知られるようになった。しかし、これら cyclic GMP 増加薬の血管拡張機序に関して、血管平滑筋の機能面から検討した研究は少ない。

以上の背景から、糖尿病時および高血圧症時における血管障害を機能的な面から検討する目的で、化学物質誘発糖尿病ラット、自然発症糖尿病ラットおよび脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) を用いて、各種摘出血管における血管平滑筋および血管内皮細胞の機能変化に関して検討を行なった。さらに、cyclic GMP 増加薬の血管拡張機序における薬理学的特性についても検討し、病態動物における血管障害との関連について併せて考察した。検討項目は以下の通りである。

- 1) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における α -adrenaline 受容体
介在性血管収縮反応の亢進と Ca^{2+} -channel の機能変化について検討した。
- 2) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体作動薬にに対する弛緩反応について検討した。
- 3) 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応について検討した。
- 4) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応および血管中 cyclic nucleotide 量の変化について検討した。
- 5) 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応に及ぼす加齢および血糖値の影響について検討した。

- 6) 自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応について検討した。
- 7) SHRSP の頸動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応および血管中 cyclic nucleotide 量の変化について検討した。
- 8) SHRSP の門脈平滑筋における protein kinase C 介在性血管収縮反応について検討した。
- 9) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化について検討した。
- 10) SHRSP の頸動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化について検討した。
- 11) Cyclic GMP 増加薬の α -adrenaline 受容体介在性血管収縮抑制作用の作用機構について検討した。
- 12) β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応の cyclic GMP 増加薬による増強作用と血管中 cyclic nucleotide 量の変化について検討した。
- 13) Protein kinase C 介在性血管収縮作用に及ぼす cyclic GMP 増加薬の抑制効果について検討した。

第1章 Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における α -adrenaline 受容体 介在性血管収縮反応の亢進と Ca^{2+} -channel の機能変化

糖尿病時には、動脈硬化症、脳血管疾患、腎症および網膜症等の血管障害に基づく種々の合併症を伴うことが知られているがその発症機序は未だ解明されていない⁴⁻¹²⁾。また、糖尿病患者は種々の神経障害を伴うことでも知られており、糖尿病性血管障害は、神経伝達物質や神経ペプチドによる血管反応性変化に起因することが示唆されている¹⁸⁾。実験的糖尿病動物における血管反応性に関しては種々の報告がある¹⁹⁾。特に、STZ 誘発糖尿病ラットの摘出胸部大動脈については、norepinephrine (NE) 誘発血管収縮反応において、感受性の変化を伴わずに最大反応のみが増強されるという報告²⁰⁻²²⁾や感受性の亢進により supersensitivity になるという報告等もある²³⁻²⁴⁾。また、一方では、NE による血管収縮反応は減弱するという報告もあり²⁵⁻²⁷⁾、統一された見解は得られていない。これらの報告に見られるような矛盾の原因は未だ明らかとはなっていないが、いずれの報告においても、NE に対する反応性変化を検討しているものの、反応性変化に関する詳細なメカニズムについては十分な検討がなされていない。また、近年、血管平滑筋細胞においては、2種類の Ca^{2+} -channel、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel (voltage-dependent Ca^{2+} -channel)および受容体制御 Ca^{2+} -channel (receptor-operated Ca^{2+} -channel)の存在が報告されている²⁸⁾。以上の背景から、本章では、1) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における α_1 -adrenaline 受容体刺激薬に対する反応性変化、および 2) α_1 -adrenaline 受容体刺激薬に対する反応性亢進時における Ca^{2+} channel の機能変化について検討した。

<実験方法>

1) 使用動物および実験的糖尿病動物の作製法

実験には、雄性 Wistar ラット 8 週齢、体重 200-220 g を用いた。糖尿病群には、pH 4.5 のクエン酸緩衝液に溶解した 60 mg/kg STZ を尾静脈より投与し、実験的糖尿病を誘発した。また、対照群には、溶媒のクエン酸緩衝液のみを静脈内投与した。その後、飲料水および餌は自由に摂取させ、STZ または溶媒投与の 8-10 週後に実験に用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solution を用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液中の Ca イオンを除去した Ca²⁺-free の Krebs-Henseleit solution を用いる際には、Ca イオンを Na イオンに置換することによって作製した。栄養液の組成は、NaCl 120 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.0mM, glucose 11.1 mM および ethyleneglycol-bis-(beta-aminoethyl ether) N,N,N,N'-tetraacetic acid (EGTA) 0.01 mM とした。Ca イオンを除去した等張性高 K の栄養液を用いる際には、栄養液中の Na イオンを K イオンに置換することにより作製した。栄養液の組成は、KCl 125 mM, MgSO₄ 1.2 mM, KHCO₃ 25.0 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11.1 mM および EGTA 0.01 mM とした。それぞれの栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

STZ または溶媒投与の 8-10 週間後に、ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本を作製した。本実験においては、血管内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF) の影響を取り除くため、血管内皮細胞は、すべて綿棒にて除去して実験を行なった。標本の

両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-611T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を、10⁻⁷ M の NE で収縮させ、反応が安定した後、10⁻⁵ M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh による血管内皮細胞依存性血管弛緩作用が認められないことをもって、血管内皮細胞が除去されていることを確認した。薬物を洗浄した 40 分後に、NE (10⁻¹⁰-10⁻⁶ M) を累積投与し、収縮反応を検討した。また、K⁺ 脱分極筋における Ca²⁺ 収縮を検討する際には、栄養液を、Ca²⁺-free の栄養液に交換し、15分後に、Ca²⁺-free の等張性高 K 溶液に脱分極させた後、CaCl₂ (0.05-5.0 mM) を累積投与することによって行なった。NE 前処置後の Ca²⁺ 収縮を検討する際には、栄養液を nicardipine (10⁻⁶ M) を含む Ca²⁺-free の栄養液に交換し、15 分後に NE (10⁻⁶ M) を投与して一過性の収縮がプラトーレベルに戻った後に、CaCl₂ (0.05-5.0 mM) を累積投与することによって検討した。また、Ca²⁺-free の栄養液中での NE および phenylephrine (PE) による律動性収縮を検討する際には、Ca²⁺-free 栄養液を、nicardipine (10⁻⁶ M) を含む Ca²⁺-free の栄養液に交換し、15 分後に NE (10⁻⁶ M) および PE (10⁻⁶ M) を投与することによって検討した。Bay K 8644 (voltage-dependent Ca²⁺-channel agonist) の作用を検討する際には、15 mM K⁺ で若干脱分極させた後、Bay K 8644 (10⁻⁶ M) を投与してその収縮反応を検討した。

5) 血糖値の測定

採血を行う際には非絶食下の午前中に行ない、血糖値は o-toluidine 法²⁹⁾にて測定した。

6) 使用薬物

streptozotocin (Sigma)

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

nicardipine hydrochloride (Sigma)

phenylephrine hydrochloride (Sigma)

acetylcholine chloride (第一製薬)

Bay K 8644 は、Bayer 社より供与された。

Bay K 8644 および nicardipine は、100 % dimethylsulfoxide に溶解した後、生理食塩水で希釈した。オルガニクス中の dimethylsulfoxide の最終濃度は 0.01 % 以下であり、血管反応には影響を与えなかった。その他の薬物は、蒸留水に溶解して実験に用いた。

7) データの解析

実験終了後に、各標本の湿重量を測定した。収縮力は、発生張力 (mg) を標本の湿重量 (mg) で割った値で表した。最大反応の 50 % を惹起するのに必要な薬物の濃度 (EC_{50} 値) は、Fleming³⁰⁾の方法に従って求めた。各データは、 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) STZ 誘発糖尿病ラットの血糖値および体重

クエン酸緩衝液を投与した対照群の 8-10 週間後の体重および血糖値は、それぞれ 485.3 ± 12.5 g (n=20) および 128.2 ± 4.0 mg/dl (n=20) であった。一方、STZ 投与群における 8-10 週後の体重および血糖値は 324.9 ± 13.9 g (n=20) および 516.3 ± 27.5 mg/dl (n=20, $P < 0.01$) であり、糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、STZ 投与群において、血糖値が 300 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

2) NE 誘発血管収縮反応

NE は、対照群および糖尿病群いずれの胸部大動脈においても、濃度依存的な収縮反応を惹起したが、NE 誘発収縮反応は、糖尿病群において反応性の亢進が認められた。対照群および糖尿病群の NE 収縮に対する EC_{50} 値は、それぞれ $5.00 \pm 1.68 \times 10^{-8}$ M (n=6) および $2.23 \pm 0.48 \times 10^{-8}$ M (n=6) であり、両群の間には有意な差は認められなかった (Fig. 1-1)。

3) 60 mM K^+ 脱分極筋および NE 前処置後の Ca^{2+} 誘発収縮反応

60 mM K^+ 脱分極筋において Ca^{2+} は、対照群および糖尿病群いずれの胸部大動脈においても濃度依存的な収縮を惹起したが、 Ca^{2+} 誘発収縮は、糖尿病群において反応性の亢進が認められた。対照群および糖尿病群の Ca^{2+} 収縮に対する EC_{50} 値は、それぞれ $5.51 \pm 0.61 \times 10^{-4}$ M (n=6) および $2.78 \pm 0.38 \times 10^{-4}$ M (n=6) であり、両群の間には危険率 5% で有意な差が認められた (Fig. 1-2)。一方、NE (10^{-6} M) 前処置後における Ca^{2+} 誘発収縮反応は、両群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 1-3)。この時の対照群および糖尿病群の Ca^{2+} 収縮に対する EC_{50} 値は、それぞれ $2.62 \pm 0.26 \times 10^{-4}$ M (n=6) および $2.91 \pm 0.66 \times 10^{-4}$ M (n=6) であった。

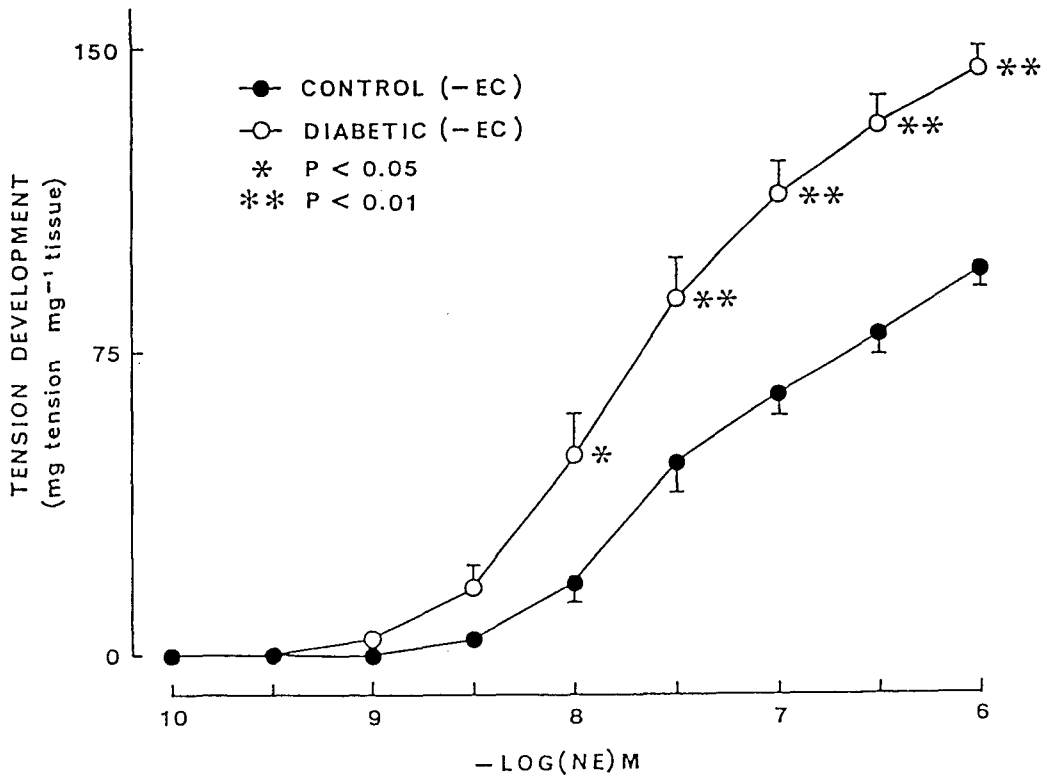


Fig. 1-1 Cumulative concentration-response curves for norepinephrine in aortic strips without endothelial cells from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. Values represent the mean from 6 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines. EC: endothelial cells.

4) Bay K 8644 誘発血管収縮反応

膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化薬である Bay K 8644 (10^{-6} M) は、対照群および糖尿病群いずれの胸部大動脈においても収縮反応を惹起し、その収縮反応は糖尿病群において、著明にその反応性が亢進していた (Figs. 1-4, 5)。対照群および糖尿病群における Bay K 8644 (10^{-6} M) 誘発収縮反応の発生張力は、それぞれ 36.4 ± 2.5 mg/mg tissue (n=6) および 53.8 ± 2.1 mg/mg tissue (n=6, $P < 0.01$) であった。

5) NE および PE による Ca^{2+} -free 液下一過性血管収縮反応

Nicardipine (10^{-6} M) を含む Ca^{2+} -free 液下の、PE (α_1 -adrenaline 受容体選択的作動薬) 誘発血管収縮反応は、糖尿病群において有意な反応性の亢進が認められた (Fig. 1-6)。対照群および糖尿病群における PE (10^{-6} M) 誘発収縮反応の発生張力は、それぞれ 29.9 ± 1.4 mg/mg tissue (n=6) および 45.9 ± 2.1 mg/mg tissue (n=6, $P < 0.01$) であった。また、NE (10^{-6} M) 誘発血管収縮反応も同様に、糖尿病群において有意な反応性の亢進が認められた (Fig. 1-6, 7)。対照群および糖尿病群における NE (10^{-6} M) 誘発収縮反応の発生張力は、それぞれ 24.5 ± 2.2 mg/mg tissue (n=6) および 36.9 ± 1.9 mg/mg tissue (n=6, $P < 0.01$) であった。

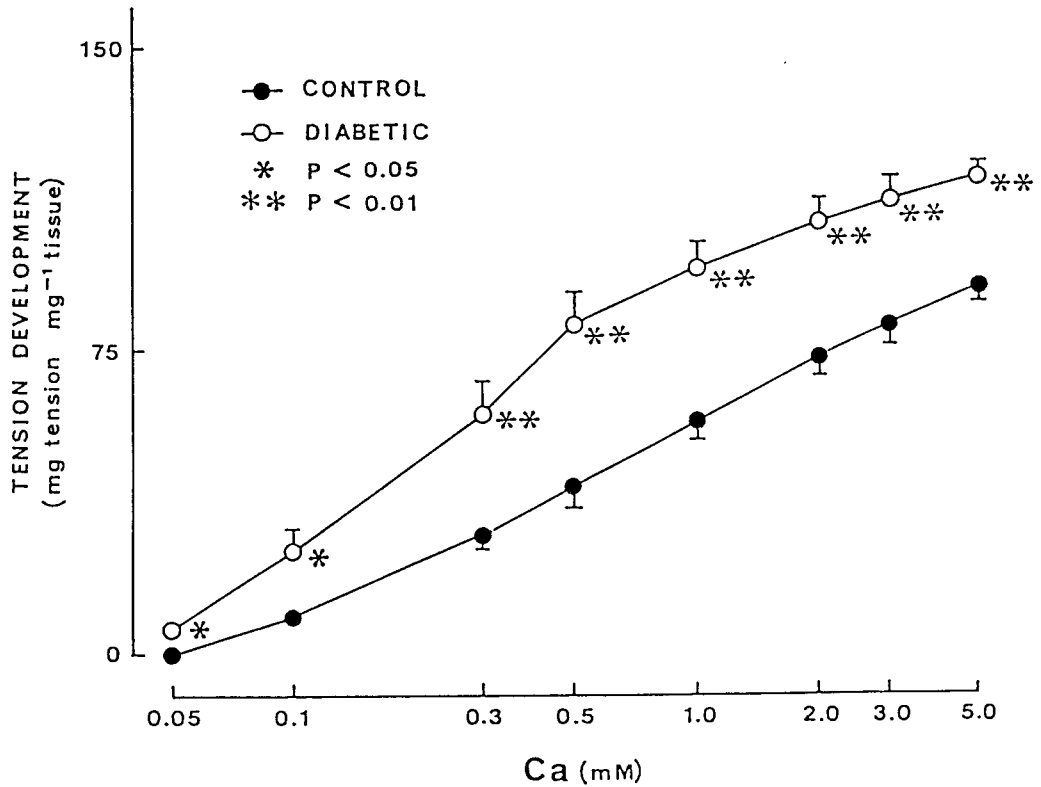


Fig. 1-2 Cumulative concentration-response curves for Ca^{2+} in aortic strips without endothelial cells from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. Aortic strips were previously depolarized with Ca^{2+} -free isotonic K^+ (60 mM). Values represent the mean from 6 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines.

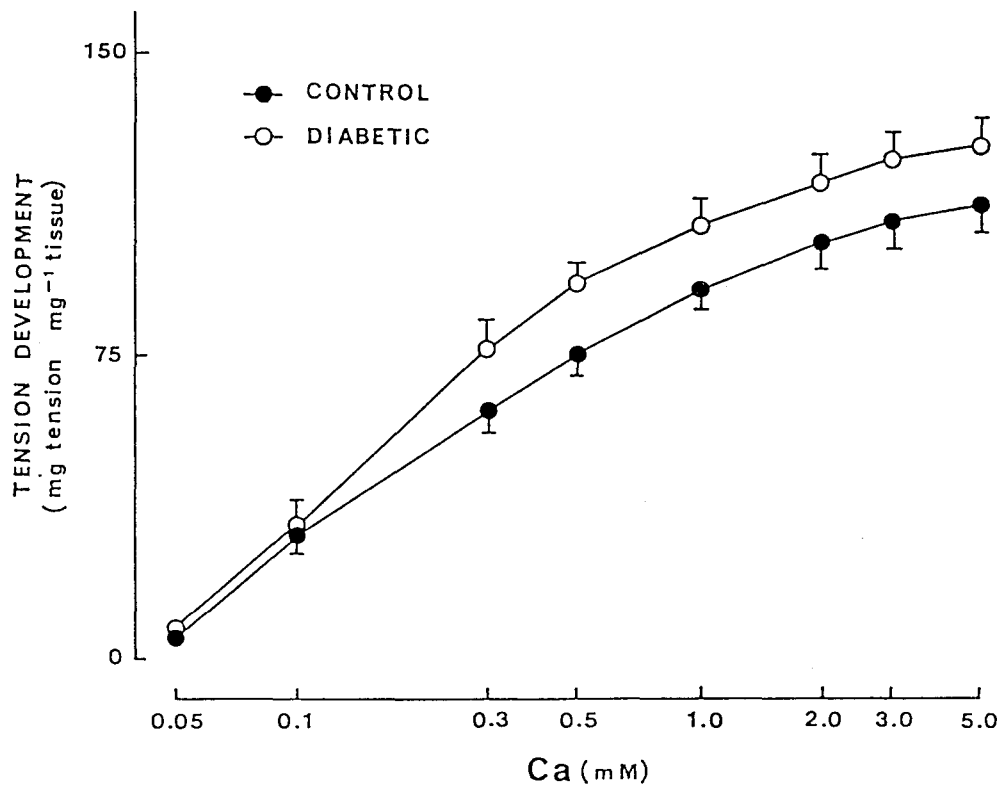


Fig. 1-3 Cumulative concentration-response curves for Ca^{2+} in aortic strips without endothelial cells from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. Aortic strips were preincubated with nicardipine (10^{-6} M) and norepinephrine (10^{-6} M) in Ca^{2+} -free solution. Values represent the mean from 6 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines.

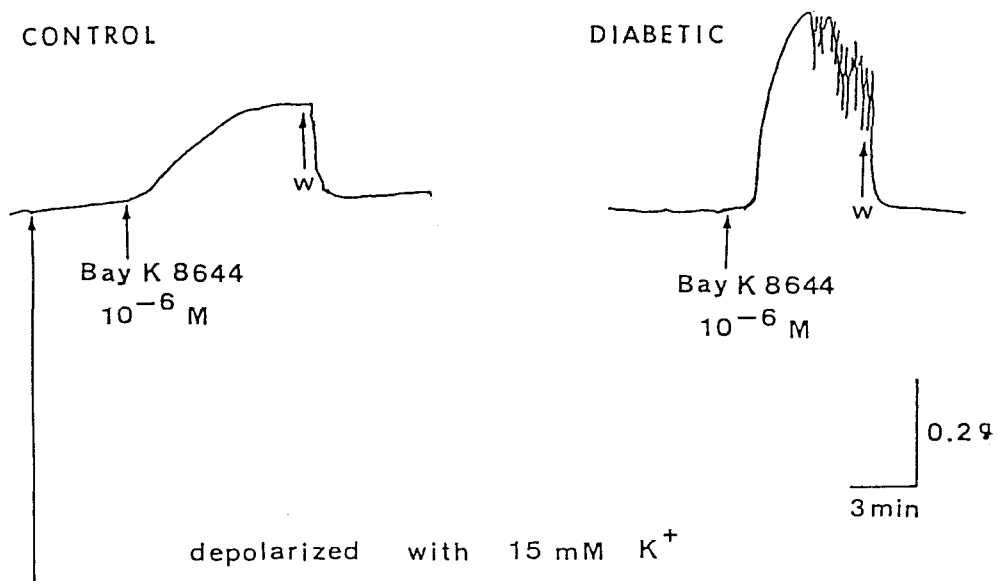


Fig. 1-4 Typical recordings of contractile responses of aorta from age-matched control and diabetic rats induced by Bay K 8644 (10^{-6} M) in the presence of isotonic K^+ (15 mM).

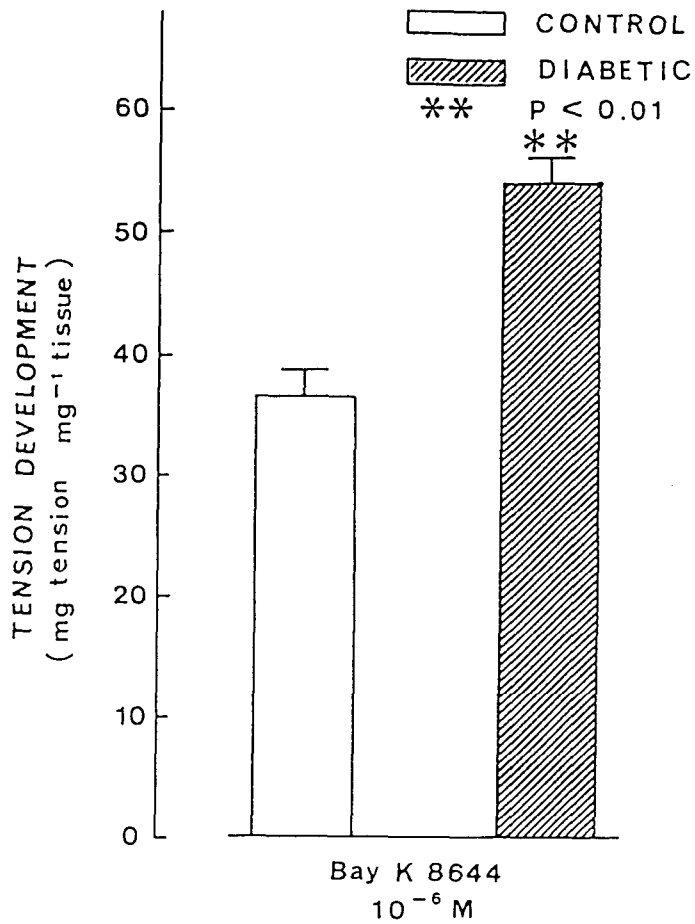


Fig. 1-5 Contractile response to Bay K 8644 (10^{-6} M) in the rat aortic strips from age-matched control and diabetic rats. Aortic strips were previously depolarized with isotonic K^+ (15 mM). Values represent the mean of 6 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines.

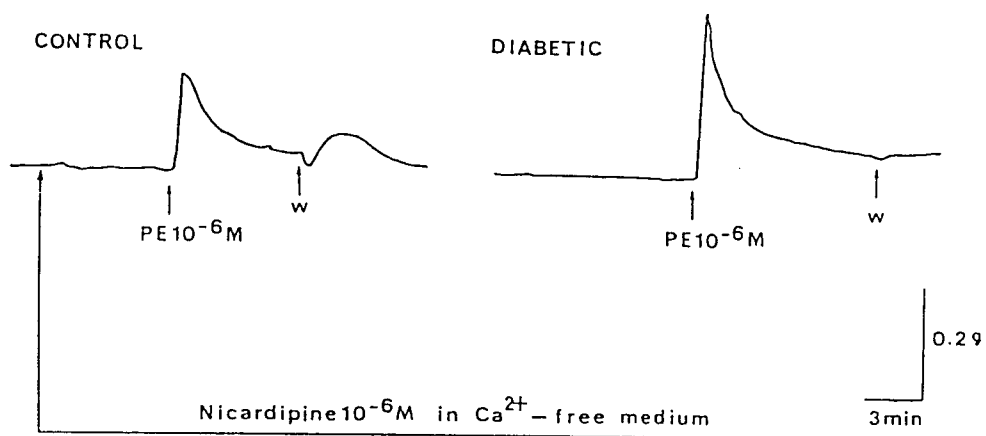


Fig. 1-6 Typical recordings of contractile responses of aorta from age-matched control and diabetic rats induced by phenylephrine (PE 10^{-6} M) in the presence of nicardipine (10^{-6} M) in Ca^{2+} -free solution.

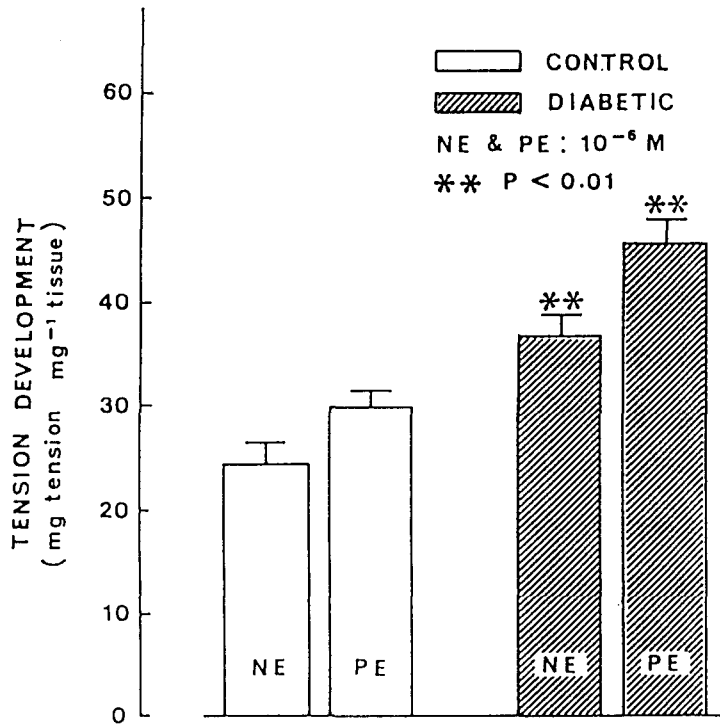


Fig. 1-7 Contractile response to phenylephrine (PE, 10^{-6} M) and norepinephrine (NE, 10^{-6} M) in aortic strips from age-matched control and diabetic rats. Aortic strips were preincubated with nicardipine (10^{-6} M) in Ca^{2+} -free solution. Values represent the mean from 6 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines.

<考察>

本実験により、実験的糖尿病ラットの摘出胸部大動脈において、NE 誘発血管収縮反応が亢進していることが明らかとなった。さらに、NE 誘発収縮の反応性亢進には、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化および phosphatidylinositol (PI) 代謝回転の亢進が関与していることが明らかとなった。

糖尿病時には、心血管系において神経伝達物質やホルモン等に対する機能変化が認められることが報告されている¹⁸⁾。この機能変化によって、糖尿病時には種々の心血管性の合併症を起こす引金となっている可能性があり検討を行なった。その結果、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈において NE に対する反応性の亢進が認められた。しかし、NE 収縮の対照群および糖尿病群における EC_{50} 値には、有意な差は認められなかったことから、 α -adrenaline 受容体の数または親和性は変化していないものと考えられた。今回認められたような NE 収縮の反応性亢進は、他の研究者たちによっても報告されている²⁰⁻²²⁾。また一方では、NE 収縮の反応性が減弱しているとの報告もある²⁵⁻²⁷⁾。この様に研究者間で、矛盾が生じている原因としては、用いた動物の種差、系統差、糖尿病誘発薬の違い、糖尿病を誘発してからの期間等の違いによる可能性が考えられるが、詳細に関しては不明である。

先に述べたように、従来までに行われていた検討では、NE に対する収縮の反応性変化のみが報告されていただけで、詳細な反応性変化のメカニズムに関しては検討が行われていなかった。そこで本研究では、NE 収縮の反応性亢進に関して Ca^{2+} -channel の機能および PI 代謝回転に注目して、更に検討を行なった。

近年、血管平滑筋細胞においては、2種類の Ca^{2+} -channel 膜電位依存性 Ca^{2+} -channel (voltage-dependent Ca^{2+} -channel) および受容体制御 Ca^{2+} -channel (receptor-operated Ca^{2+} -channel) の存在が報告されている²⁸⁾。そこで前者の機能変化を検討する目的で、 K^+ 脱分極筋における Ca^{2+} 誘発収縮を、また、後者を検討する目的で NE 前処置後の Ca^{2+} 誘発収縮を検討した。その結果、 K^+ 脱分極筋における Ca^{2+} 収縮は、糖尿病群において著明に反応性が亢進していたことから、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel が活性化状態にあることが示唆された。一方、NE 前処置後の Ca^{2+} 誘発収縮に関しては、両群の間に有意な差は認められなかったことから、受容体制御 Ca^{2+} -channel の活性は両群の間に差がないことが明らかとなった。これらの実験により、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化が示唆されたことから、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化薬である

Bay K 8644³¹⁾ による収縮反応を検討したところ、糖尿病群において著明に反応性が増強されていたことから、糖尿病時における血管平滑筋の膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化が、更に強く示唆された。

また、近年血管平滑筋において NE による血管収縮反応においては、PI 代謝回転が重要な役割を演じていることが報告されている³²⁻³³⁾。NE 等の受容体刺激薬が受容体に結合すると、細胞膜のリン脂質である PI が加水分解され、inositol trisphosphate (IP_3) と diacylglycerol (DG) が生成される³⁴⁾。この IP_3 が、細胞内 Ca 貯蔵部位の IP_3 受容体に働いて、 Ca^{2+} を放出させ初期相に生ずる一過性の血管収縮を引き起こすと考えられている^{35,36)}。そこで、本実験では、NE および PE による Ca^{2+} -free 液下一過性血管収縮反応検討した。その結果、これらの α -adrenaline 受容体刺激薬による律動性血管収縮反応は、糖尿病群において有意に反応性の増強が認められた。以上のことから、糖尿病時の血管平滑筋において、 α -adrenaline 受容体刺激時の PI 代謝回転が亢進していることが間接的に示された。

以上のことから、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈において、 α -adrenaline 受容体介在性血管収縮作用が亢進していることが明らかとなった。また、NE 収縮反応性の亢進には、受容体制御 Ca^{2+} -channel ではなく膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化が関与していることが示された。さらに、NE 収縮の反応性亢進には、一部、PI 代謝回転の亢進も寄与していることが示唆された。

第2章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体作動薬に対する弛緩反応の減弱

第1章での検討から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における α -adrenaline 受容体介在性血管収縮の反応性が亢進していることが明らかとなった。この反応性亢進は、受容体制御 Ca^{2+} -channel ではなく膜電位依存性 Ca^{2+} -channel の活性化および phosphatidylinositol 代謝回転の亢進に起因していることが示唆された³⁷⁾。そこで本実験においては、adrenaline 受容体のもう一つのサブタイプである β -adrenaline 受容体に着目して、糖尿病時における血管反応性の変化を検討した。血管平滑筋における β -adrenaline 受容体は、その受容体刺激によって、細胞内 cyclic AMP 濃度を上昇させ、血管弛緩性に働いていることが知られている³⁸⁾。この β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応は高血圧症動物においては著明に減弱していることが報告されており³⁹⁻⁴¹⁾、このことが、高血圧症時の末梢血管抵抗の増大にも関与していることが知られている。しかし、糖尿病動物の血管平滑筋における β -adrenaline 受容体の機能を検討した報告はない。

1980 年に、Furchgott と Zawadzki⁴²⁾ によって、血管内皮細胞の機能が明らかとなり、acetylcholine (ACh) による血管弛緩反応は、血管内皮細胞の存在に依存する血管弛緩反応であることが報告された。その後の検討によって、血管内皮細胞依存性に働く物質が複数存在することが報告されている。そこで、 β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応に及ぼす内皮細胞の影響についても併せて検討した。

<実験方法>

1) 使用動物および実験的糖尿病動物の作製法

実験には、雄性 Wistar ラット 8 週齢、体重 200-220 g を用いた。糖尿病群には、pH 4.5 のクエン酸緩衝液に溶解した 60 mg/kg STZ を尾静脈より投与し、実験的糖尿病を誘発した。また、対照群には、溶媒のクエン酸緩衝液のみを静脈内投与した。その後、飲料水および餌は、自由に摂取させ、STZ または溶媒投与の 8-10 週後に実験に用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solution を用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

STZ または溶媒投与の 8-10 週間後に、ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は、血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本作製した。血管内皮細胞除去群の検討を行う際には、血管内皮細胞は、綿棒にて除去して実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-611T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間ブレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のブレインキューベーションの後、血管を 10^{-7} M の NE で収縮させ、反応が安定した後に、 10^{-5} M の ACh を投与した。この際、ACh (10^{-5} M) による弛緩反応が、NE (10^{-7} M) に対して、80% 以上認められる場合を、内皮細胞存在群とし、ACh による血管内皮細胞依存性血管弛緩作用が、全く認められない標本を内皮細胞除去群とした。

4-1) 血管弛緩反応の検討

薬物を洗浄した 40 分後に、equieffective な濃度の NE (3×10^{-8} - 10^{-7} M) で血管を収縮させ、反応が安定した後に、isoproterenol (ISO, 10^{-8} - 10^{-5} M)、forskolin (FSK, 10^{-8} - 10^{-6} M) または、sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9} - 10^{-6} M) を累積的に投与し、血管弛緩反応を検討した。

4-2) 血管収縮作用の検討

血管収縮作用を検討する際には、1 g の静止張力の状態に ISO (10^{-8} - 10^{-3} M) を累積的に投与してその収縮作用を検討した。Methylene blue (10^{-6} M) または phentolamine (10^{-7} M) の影響を検討する際には、これらの薬物を 15 分間前処置した後に、ISO を累積的に投与してその影響を検討した。

5) 血糖値の測定

採血を行う際には非絶食下の午前中に行い、血糖値は o-toluidine 法²⁹⁾にて測定した。

6) 使用薬物

streptozotocin (Sigma)

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

isoproterenol hydrochloride (Sigma)

methylene blue (Sigma)

sodium nitroprusside (Sigma)

phentolamine mesylate (Ciba Geigy)

acetylcholine chloride (第一製薬)

forskolin は、日本化薬（株）より供与された。

Forskolin は、100 % ethanol に溶解して実験に用いた。オルガンバス中の ethanol の最終濃度は0.05 % 以下であり、血管反応には影響を与えなかった。その他の薬物は、蒸留水に溶解して実験に用いた。

7) データの解析

実験終了後に、各標本の湿重量を測定した。収縮力は、発生張力 (mg) を標本の湿重量 (mg) で割った値で表した。血管弛緩反応は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。最大反応の 50 % を惹起するのに必要な薬物の濃度 (EC_{50} 値) は、Fleming ら³⁰⁾の方法に従って求めた。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は、NE による収縮を 50 % 抑制する血管拡張薬の濃度として示した。各データは、 $mean \pm S.E.$ で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) 対照群における ISO, FSK および SNP による血管弛緩反応

ISO は NE で収縮させた胸部大動脈を血管内皮細胞存在群、血管内皮細胞除去群のいずれにおいても、濃度依存的に血管弛緩反応を示したが、血管内皮細胞存在群においてその血管弛緩反応は強く認められた (fig. 2-1)。同様に、FSK (adenylate cyclase 活性化薬⁴³⁾) および SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬¹⁶⁾) による血管弛緩反応を内皮細胞存在下または非存在下で検討したところ、これらの化合物には、血管内皮細胞の有無とは無関係に濃度依存的に同程度の血管弛緩反応を示した。

2) 対照群における ISO 誘発血管収縮作用

静止レベルの胸部大動脈に、ISO を累積的に投与すると、高濃度において、血管収縮作用を惹起した。この ISO による血管収縮作用は、血管内皮細胞を除去することにより有意に増強された (fig. 2-1)。また、methylene blue (10^{-6} M、soluble guanylate cyclase 阻害薬) を前処置することによりその血管収縮作用は有意に増強された (fig. 2-1)。

3) 対照群および糖尿病群における血糖値および体重

クエン酸緩衝液を投与した対照群の8-10 週間後の体重および血糖値は、それぞれ 453.0 ± 9.9 g (n=20) および 113.6 ± 2.9 mg/dl (n=20) であった。一方、STZ 投与群における 8 週間後の体重および血糖値は、それぞれ 277.0 ± 11.0 g (n=20) および 755.5 ± 44.0 mg/dl (n=20, $P < 0.01$) であり、糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、STZ 投与群において、血糖値が 300 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

4) 糖尿病群における ISO 誘発血管弛緩反応

糖尿病群においても、ISO は、NE で収縮させた胸部大動脈を濃度依存的に弛緩させたが、この作用は対照群で認められた場合と同様に血管内皮細胞の除去によってその作用は減弱した (fig. 2-2)。糖尿病群における ISO 誘発血管弛緩作用の程度は、血管内皮細胞の有無に関わらず対照群に比べて有意に減弱していた。

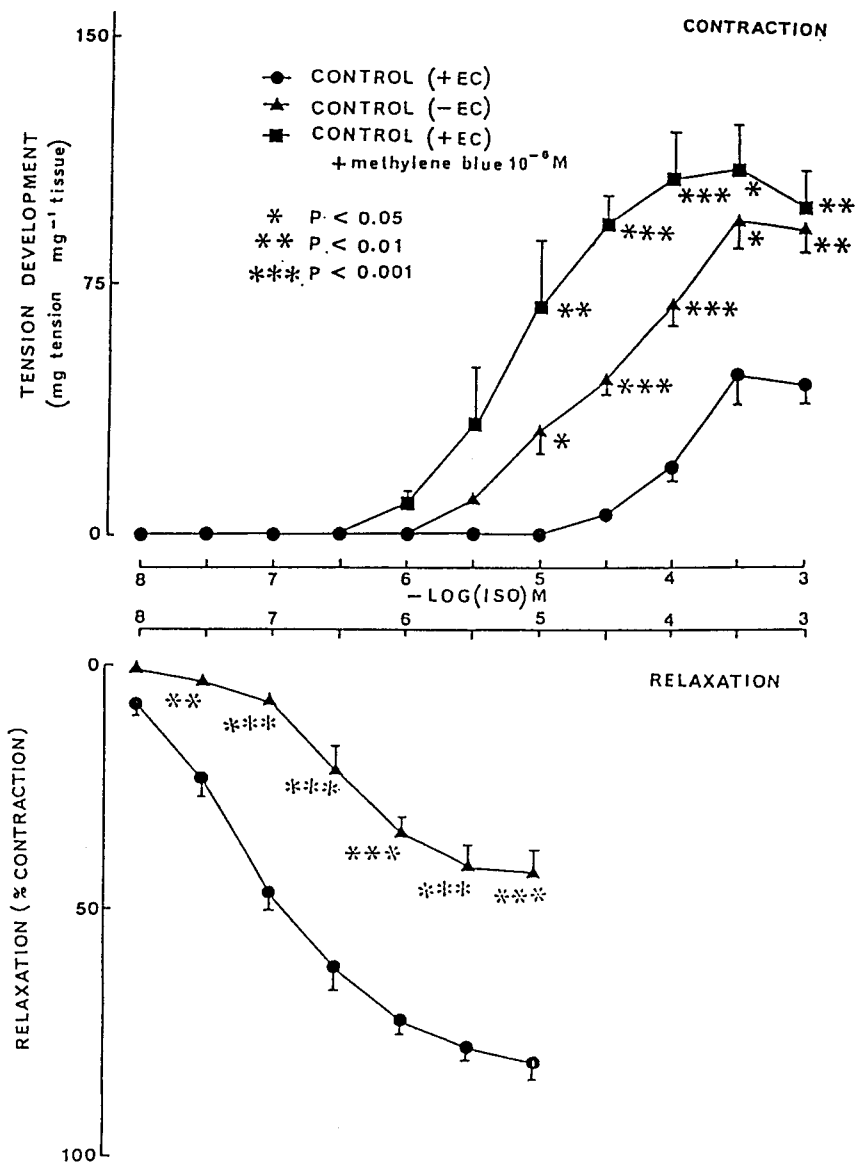


Fig. 2-1 Concentration-response curves for the contractile responses to isoproterenol (ISO) of aortic strips with endothelium (●), without endothelium (▲) and with endothelium plus pretreatment with methylene blue (10^{-6} M) for 10 min (■) from naive rats. (Upper trace)

Concentration-response curves for the relaxation responses to ISO of aortic strips with (●) and without (▲) endothelium from naive rats. The aortic strips were precontracted with norepinephrine (3×10^{-8} - 10^{-7} M).

Values represent the means of results of 6 experiments, respectively, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (Lower trace)

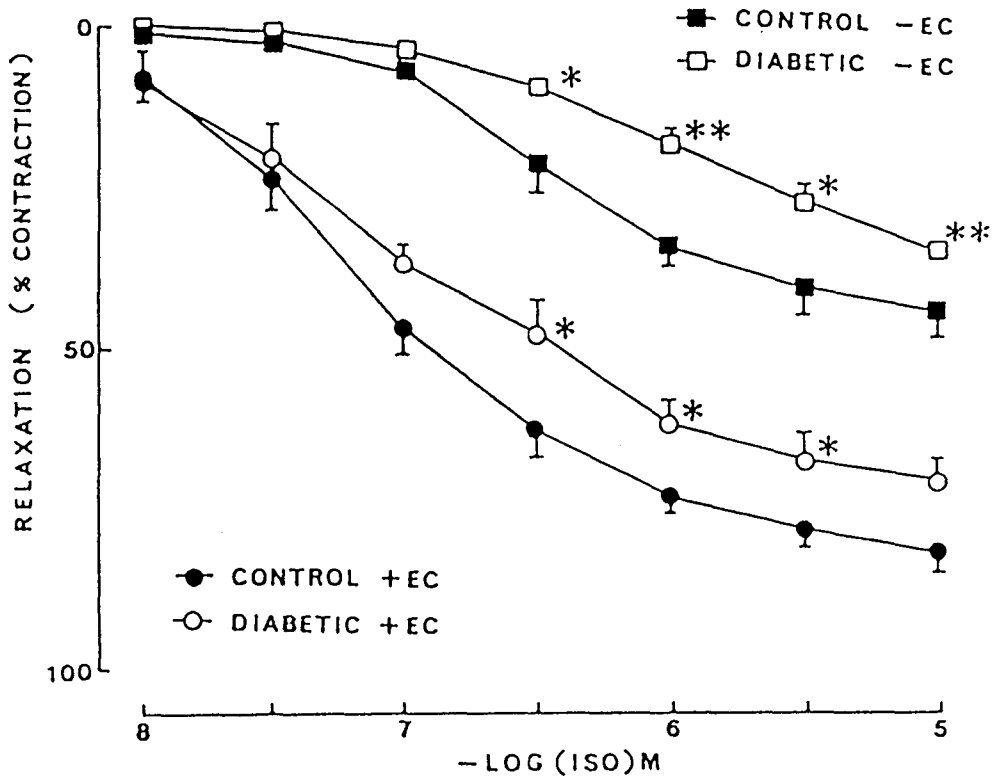


Fig. 2-2 Concentration-response curves for the relaxation responses to isoproterenol (ISO) of aortic strips with endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) and without endothelium from age-matched control (■) and diabetic (□) rats. The aortic strips were precontracted with norepinephrine (3×10^{-8} - 10^{-7} M). Values represent the means of results of 6 experiments, respectively, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,

5) 糖尿病時における FSK および SNP 誘発血管弛緩作用

対照群における検討から、FSK および SNP による血管弛緩反応は、血管内皮細胞の存在に依存しないことが明らかとなっているので、糖尿病時においては、血管内皮細胞除去群についてのみそれぞれの作用を検討した。糖尿病群の内皮細胞を除去した胸部大動脈において、FSK および SNP はいずれも濃度依存的な血管弛緩反応を示した (fig. 2-3)。これらの血管弛緩反応の程度は、対照群とほぼ同様の結果で、両者の間には有意な差は認められなかった。

対照群および糖尿病群の胸部大動脈における各種血管弛緩薬の IC_{50} を、table 2-1 に示した。

6) 糖尿病群における ISO 誘発血管収縮作用

糖尿病時において、高濃度の ISO は、血管内皮細胞の有無に関係なく血管収縮作用を惹起した。これらの作用は、対照群と比較すると糖尿病時において有意に増強されていた (fig. 2-4)。対照群および糖尿病群の胸部大動脈における ISO 誘発血管収縮作用の EC_{50} を、table 2-2 に示した。

7) 糖尿病群における ISO 誘発血管収縮作用に及ぼす phentolamine の影響

糖尿病群における胸部大動脈での ISO 誘発血管収縮作用は 10^{-7} M phentolamine の前処置により有意に拮抗され、ISO の濃度反応曲線は右方にシフトした (fig. 2-5)。さらに、 10^{-6} M の phentolamine の前処置により、ISO 誘発血管収縮作用は完全に消失した。

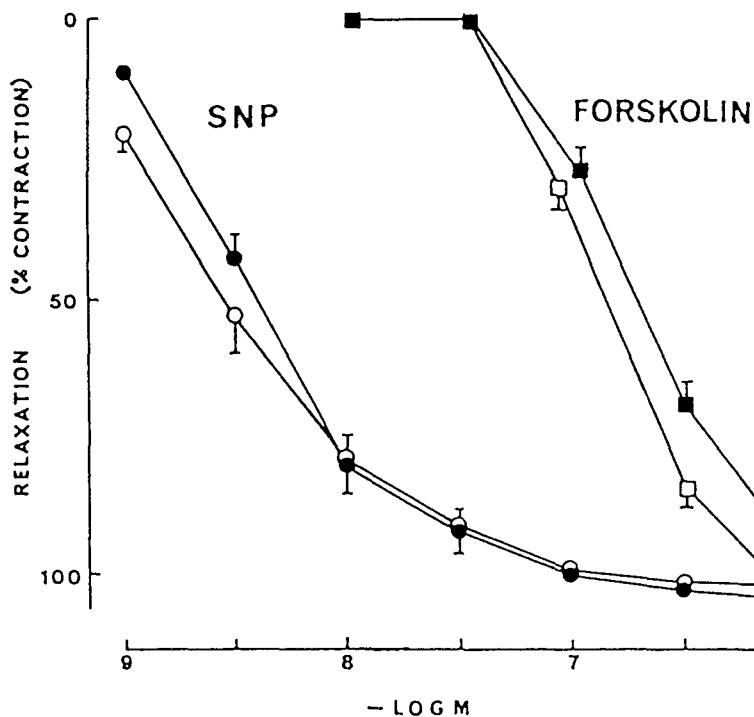


Fig. 2-3 Concentration-response curves for the relaxation responses to forskolin of aortic strips without endothelium from age-matched control (■) and diabetic (□) rats. Concentration-response curves for the relaxation responses to sodium nitroprusside of aortic strips without endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. The aortic strips were precontracted with norepinephrine (3×10^{-8} - 10^{-7} M). Values represent the means of results of 6 experiments, respectively, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines.

Table 2-1 IC₅₀ values for isoproterenol (ISO)-induced, forskolin (FSK)-induced and sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation of aortic strips from age-matched control and diabetic rats

Drugs	Control (n=6)	Diabetic (n=6)
ISO (+EC)	7.96 ± 1.98 x 10 ⁻⁸ M	1.40 ± 0.51 x 10 ⁻⁷ M *
ISO (-EC)	3.73 ± 0.67 x 10 ⁻⁷ M	8.95 ± 1.20 x 10 ⁻⁷ M *
FSK (-EC)	2.50 ± 0.55 x 10 ⁻⁷ M	1.81 ± 0.18 x 10 ⁻⁷ M
SNP (-EC)	3.46 ± 0.66 x 10 ⁻⁹ M	4.30 ± 0.60 x 10 ⁻⁹ M

Values are means ± S.E. n, number of animals, EC, endothelial cells.

* Statistically different from age-matched control (P < 0.05).

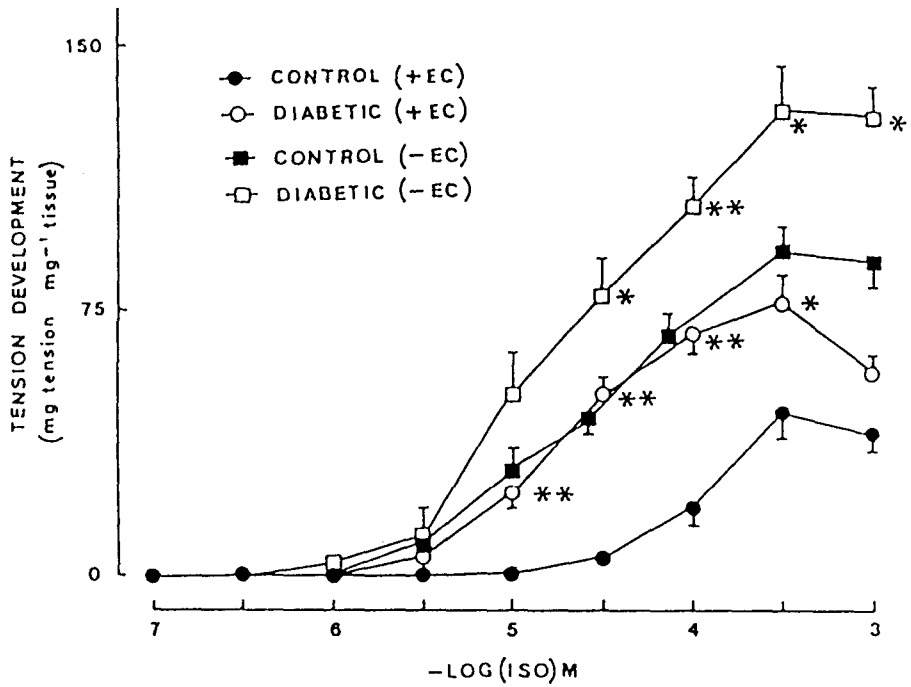


Fig. 2-4 Cumulative concentration-response curves for the contractile responses to isoproterenol (ISO) of aortic strips with endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) rats and without endothelium from age-matched control (■) and diabetic (□) rats. Values represent the means of results from 6 experiments, respectively, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. EC: endothelial cells.

Table 2-2 EC₅₀ values for isoproterenol (ISO)-induced contraction of aortic strips from age-matched control and diabetic rats

Drug	Control (n=6)	Diabetic (n=6)
ISO (+EC)	1.78 ± 0.07 x 10 ⁻⁴ M	1.73 ± 0.33 x 10 ⁻⁵ M *
ISO (-EC)	2.04 ± 0.48 x 10 ⁻⁵ M	1.43 ± 0.29 x 10 ⁻⁵ M

Values are means ± S.E. n, number of animals, EC, endothelial cells.

* Statistically different from age-matched control (P < 0.05).

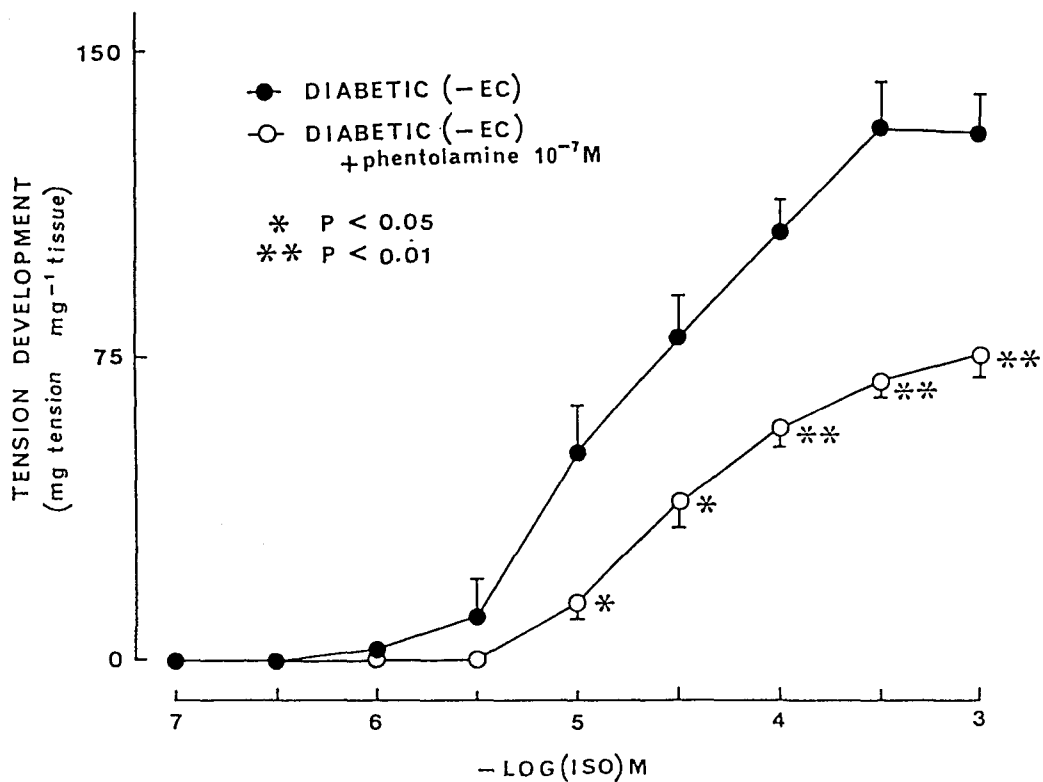


Fig. 2-5 Effects of treatment with phentolamine of aortic strips without endothelium on the concentration-response curves for isoproterenol (ISO). The aortic strips were exposed to 10⁻⁷ M phentolamine for 10 min and then ISO was added to the bath cumulatively. Values represent the means of results from 6 experiments, respectively, with the means ± S.E. indicated by vertical lines. * P < 0.05, ** P < 0.01. EC: endothelial cells.

<考察>

本実験により、ラット胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応は、血管内皮細胞の存在に一部依存していることが明らかとなった。さらに、実験的糖尿病ラットの摘出胸部大動脈において、ISO 誘発血管弛緩反用の減弱および ISO 誘発血管収縮作用が亢進することが明らかとなった。

Furchgott と Zawadzki⁴²⁾ や Fridovich⁴⁴⁾ らの報告によると、血管での β -adrenaline 受容体は、血管平滑筋細胞上の β -adrenaline 受容体に結合し、血管内皮細胞非依存性の血管弛緩反応を示すと一般には考えられていた。しかし、Steinberg⁴⁵⁾ らによって、ウシ大動脈の培養内皮細胞上には、 β -adrenaline 受容体が存在することが報告されている。本実験の検討からは、ラット胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応は、血管内皮細胞除去標本よりも、血管内皮細胞存在標本の方が弛緩反応が強かった。しかし、血管平滑筋直接作用を有する FSK (adenylate cyclase 活性化薬⁴³⁾) および SNP (guanylate cyclase 活性化薬¹⁶⁾) は、血管内皮細胞の有無に関わらず血管を同様に弛緩させたことから ISO が、部分的に血管内皮細胞依存性に血管を弛緩することが示唆された。尚、本実験において、ISO 誘発血管弛緩反応が内皮細胞の除去により減弱していたが、この点に関しては、FSK および SNP の実験から、血管内皮細胞の除去が、平滑筋側の機能を障害するためであるという可能性は排除される。

本実験において、高濃度の ISO は、静止レベルのラット胸部大動脈を収縮させた。この血管収縮作用は、血管内皮細胞の除去によって増強されたことから、ISO 誘発血管収縮において、血管内皮細胞が抑制的に働いていることが明らかとなった。さらに、methylene blue (guanylate cyclase 阻害薬⁴⁷⁾) の前処置によっても ISO 誘発収縮は増強された。これに関して、Martin らは、血管内皮細胞からは、血管内皮細胞弛緩因子 (EDRF (NO)) が、常時、産生、放出されており、その産生が、methylene blue により抑制されることを報告している⁴⁷⁾。従って、ISO による血管収縮作用にも、内皮細胞からの EDRF (NO) が関与している可能性が強く示唆された。また、ISO 誘発血管収縮作用は、 α -adrenaline 受容体拮抗薬である phentolamine によって拮抗されたことから、血管平滑筋上の、 α -adrenaline 受容体を介している可能性が示唆された。このことは、ラットの胸部大動脈が他の種と比較して、非常に多くの α_1 -adrenaline 受容体を含んでいるという Ruffolo⁴⁸⁾ らの報告とも相関する。

糖尿病群の胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応は内皮細胞が存在する場合にも、存在しな

い場合においても、対照群と比較すると作用が減弱していた。しかし、FSK および SNP による血管弛緩反応は、両群の間には有意な差は認められなかったことから、糖尿病時における ISO 誘発血管弛緩反応の減弱は、平滑筋側の adenylylase または guanylylase 活性の異常によるものではないことが示唆された。この糖尿病動物における臓器の β -adrenaline 受容体の機能異常に関しては、すでにラット胃底部平滑筋⁴⁹⁾ および心臓⁵⁰⁾ において報告がなされている。この点に関して、興味深いことには、糖尿病患者の norepinephrine および epinephrine 等の血漿中 catecholamine 濃度が健常者に比べて高いことが報告されている⁵¹⁾。従って、これらの報告から、糖尿病時における β -adrenaline 受容体機能低下の原因としては、血漿中 catecholamine の上昇に伴う β -adrenaline 受容体の down-regulation が、関与している可能性が考えられるが、詳細に関しては明らかとなっていない。

さらに、ISO 誘発血管収縮作用においても、糖尿病群において内皮細胞の有無に関わらず有意な反応性の亢進が認められた。このことから、糖尿病時における ISO 誘発血管収縮作用の亢進は、 α -adrenaline 受容体介在性血管収縮の増強および血管内皮細胞上の β -adrenaline 受容体の機能低下に起因していることが示唆された。すでに、糖尿病時における α -adrenaline 受容体介在性血管収縮の亢進に関しては、第1章で詳細に検討しており³⁷⁾、第1章の結果ともよく相関する結果となった。

以上のことから、糖尿病時には adrenaline 受容体の機能は α subtype では機能の上昇、 β subtype では機能の低下を発現することが明らかとなった。本実験に関する報告は、1) ラット胸部大動脈において、ISO 誘発血管弛緩反応が、血管内皮細胞の存在に一部依存する。2) 実験的糖尿病動物の血管平滑筋における β -adrenaline 受容体の機能が低下する。といういずれにおいても最初の報告であり、後に、この実験を支持する報告がしばしば見られる。

第3章 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体作動薬 に対する弛緩反応の減弱

第2章での検討から、ISO 誘発血管弛緩反応が血管内皮細胞に一部依存した弛緩反応を示すことさらに、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩作用が減弱し、特異的にその機能が障害されていることを見いだした⁵²⁾。そこで、本章では、I型糖尿病を自然発症する動物である WBN/Kob ラットを用いて、胸部大動脈における β -adrenaline 受容体の機能変化を検討した。WBN/Kob ラットは、ドイツの Bonn 大学で腫瘍に関する研究用として繁殖されていた Wistar 系に由来するラットである。その後、1976 年に Dr. Kobori によって日本に持ち込まれ、糖尿病を自然発症することが見いだされたという^{53, 54)}。特徴としては、生後 60 週前後に I 型の糖尿病を自然発症するという極めて希な動物であり、その発症機序やその他に関しては不明な点が多く今後の研究の進展が望まれている。このような背景から、STZ 誘発糖尿病ラットで認められた血管平滑筋の β -adrenaline 受容体機能低下が自然発症糖尿病ラットにおいても認められるかどうかを検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 WBN/Kob ラット 70-75 週齢および対照群には同週齢の Wistar 系ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solution を用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は調製後、95 % O₂-5 % CO₂の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

ラットは、頭部を殴打し、総頸動脈から脱血させることにより致死させた。この際、血液は、血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液の中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本作製した。血管内皮細胞除去群の検討を行う際には、血管内皮細胞は、綿棒にて除去して実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を、10⁻⁷ M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、10⁻⁵ M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10⁻⁵ M) に

よる弛緩反応が、NE (10^{-7} M) に対して、80% 以上認められる場合を内皮細胞存在群とし、ACh による血管内皮細胞依存性血管弛緩作用が、全く認められない標本を内皮細胞除去群とした。薬物を洗浄した 40 分後に、 10^{-7} M の濃度の NE で血管を収縮させ、反応が安定した後に、isoproterenol (ISO, 10^{-8} - 10^{-5} M), forskolin (FSK, 10^{-8} - 10^{-6} M) または、vasoactive intestinal peptide (VIP, 10^{-9} - 10^{-6} M) を累積的に投与し、血管弛緩反応を検討した。

5) 血糖値の測定

採血する際には、非絶食下の午前中に行い、血糖値の測定は自動分析装置 (Hitachi 7150) を用いて glucoseoxidase 法で行なった。

6) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

isoproterenol hydrochloride (Sigma)

acetylcholine chloride (第一製薬)

vasoactive intestinal peptide (Sigma)

forskolin は、日本化薬 (株) より供与された。

Forskolin は、100 % ethanol に溶解して実験に用いた。オルガンバス中の ethanol の最終濃度は 0.05 % 以下であり、血管反応には影響を与えなかった。その他の薬物は蒸留水に溶解して実験に用いた。

7) データの解析

血管弛緩反応は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は、NE による収縮を 50 % 抑制する血管弛緩薬の濃度として示した。各データは、mean \pm S.E. で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) 対照群および自然発症糖尿病群における血糖値

対照群における実験使用時の血糖値は 116.5 ± 4.5 mg/dl (n=10)、自然発症糖尿病群における血糖値は 385.0 ± 20.3 mg/dl (n=10, $P < 0.01$) であり、自然発症糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、糖尿病群において、血糖値が 200 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

2) 対照群および自然発症糖尿病群の胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応

対照群および自然発症糖尿病群の胸部大動脈において、ISO は血管内皮細胞存在標本においても血管内皮細胞除去群においても、いずれも濃度依存的に血管弛緩反応を示したが、血管内皮細胞存在群においてその血管弛緩反応は強く認められた (fig. 3-1)。また、自然発症糖尿病群における ISO 誘発血管弛緩反応は対照群と比較すると、内皮細胞の有無に関係なく減弱していた。

3) 対照群および自然発症糖尿病群の胸部大動脈における FSK および VIP 誘発血管弛緩反応

対照群および自然発症糖尿病群の胸部大動脈において、FSK は濃度依存的な血管弛緩反応を示した (fig. 3-2)。しかし、FSK 誘発血管弛緩反応は両群の間に有意な差は認められなかった。また、対照群および自然発症糖尿病群の胸部大動脈において、VIP は濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、その血管弛緩反応は FSK と比較すると弱く、最大弛緩反応は約 30 % 程度であった (fig. 3-2)。この VIP 誘発血管弛緩反応は FSK と同様に両群の間に有意な差は認められなかった。

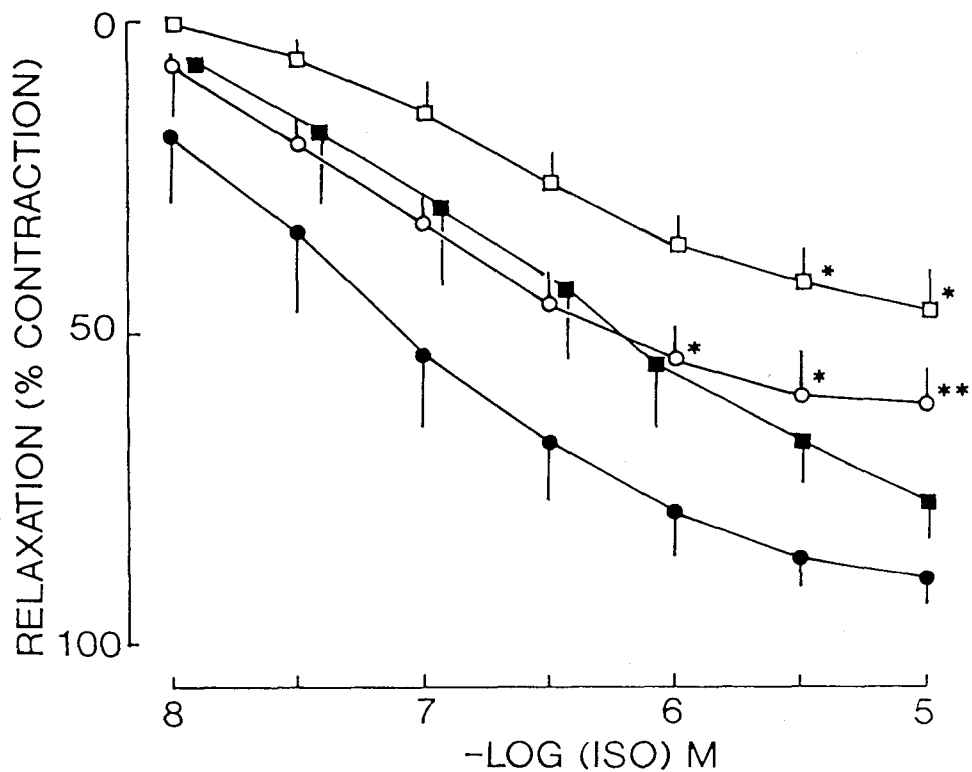


Fig. 3-1 Concentration-response curves for the relaxation responses to isoproterenol (ISO) of aortic strips with endothelium from age-matched Wistar (●) and WBN/Kob (○) rats and without endothelium from age-matched Wistar (■) and WBN/Kob (□) rats. The aortic strips were precontracted with 10^{-7} M norepinephrine. Values represent the mean of the results of 5 experiments, respectively, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

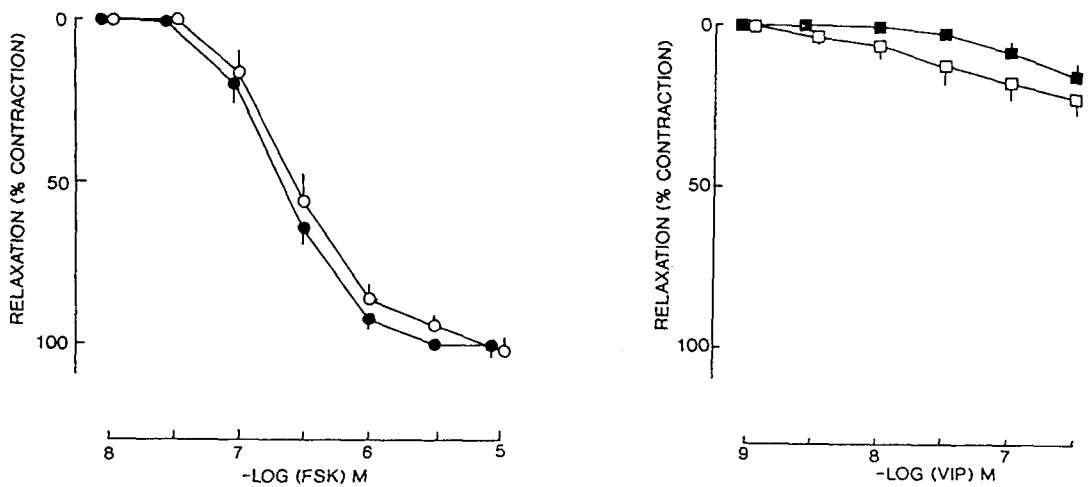


Fig. 3-2 Concentration-response curves for the relaxation responses to forskolin (FSK) of aortic strips without endothelium from Wistar (●, n=6) and WBN/Kob (○, n=6) rats. Concentration-response curves for the relaxation responses to vasoactive intestinal peptide (VIP) of aortic strips without endothelium from Wistar (■, n=6) and WBN/Kob (□, n=6) rats. The aortic strips were precontracted with 10^{-7} M norepinephrine. The results are expressed as mean \pm S.E. indicated by vertical lines.

<考察>

第2章での検討から、著者はラット胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応が血管内皮細胞の存在に一部依存することを明らかにした⁵²⁾。本実験においても、ラット胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩反応は、血管内皮細胞の存在に一部依存することが再確認された。また、さらに自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈においても、STZ 誘発糖尿病ラットと同様に、 β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応が減弱していることが明らかとなった。

また、本実験から自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットの胸部大動脈において、ISO 誘発血管弛緩反応は、血管内皮細胞の有無に関わらず、対照群と比べて有意に減弱することが明らかとなった。さらに、adenylate cyclase 活性化薬である FSK⁴³⁾ による血管弛緩反応は、両群の間に有意な差は認められなかったことから、糖尿病時における血管平滑筋側の adenylate cyclase 活性には変化がなく、ISO による β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応の減弱は、 β -adrenaline 受容体の機能的な変化に起因することが示唆された。

VIP は、血管内皮細胞非依存性に血管中 cyclic AMP を増加させて血管弛緩反応を示す神経ペプチドである⁵⁵⁾。そこで著者は、VIP を β -adrenaline 受容体を介さない別の cyclic AMP 増加薬と考え、自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における VIP 誘発血管弛緩反応を検討した。その結果、VIP による血管弛緩反応も両群の間には有意な差は認められなかった。以上のことから、自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈においては、cyclic AMP 産生系において、 β -adrenaline 受容体の機能のみが、特異的に障害されていることが示唆された。第2章でも述べたように、糖尿病患者の血清中 catecholamine 濃度は、健常人と比較して高いことが報告されているため⁵¹⁾、 β -adrenaline 受容体の down-regulation が起こり、機能低下が起こっている可能性が示唆された。

第2章での検討では、STZ 誘発糖尿病ラットでも同様に ISO 誘発血管弛緩反応が減弱していたが、STZ 誘発糖尿病動物では血糖値が 755.5 ± 44.0 mg/dlであったのに対して本章で用いた自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットでは 385.0 ± 20.3 mg/dl と STZ 誘発糖尿病ラットに比べて WBN/Kob ラットの方が血糖値は低く病態としては軽症の糖尿病であると考えられた。以上のことから、化学物質誘発性の STZ 誘発糖尿病ラットにおいても、自然発症糖尿病モデルの WBN/Kob ラットにおいても、 β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応の減弱が認められたが、これらの糖尿

病モデルにおいては、 β -adrenaline 受容体の機能低下は血糖値の程度に関わらず、I型糖尿病モデルにおける普遍的な現象である可能性が示唆された。

第4章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応の減弱と血管中 cyclic nucleotide 量の変化

1980年に、FurchgottとZawadzki⁴²⁾によって、acetylcholine (ACh)による血管拡張作用における血管内皮細胞の機能が明らかとなり、ACh誘発血管弛緩反応が血管内皮細胞の存在に完全に依存する作用であることが報告された。その後の検討により、現在ではAChをはじめとして histamine, serotonin, adenosine triphosphate, platelet activating factor, substance P, bradykinin等の様々な生体内物質が血管内皮細胞に依存して血管弛緩反応を示すことが明らかとなっている⁵⁵⁻⁵⁶⁾。これらの血管内皮細胞依存性弛緩物質が内皮細胞上の受容体に結合すると、血管内皮細胞由来弛緩物質 (endothelium-derived relaxing factor (EDRF)) と呼ばれる極めて不安定な物質が放出され、この EDRF が血管中の cyclic GMP 量を増加させて、血管弛緩作用を示すことが明らかとなっていた⁵⁸⁻⁶⁰⁾。その後、1987年に Moncada のグループ⁶¹⁾によって、EDRFの本体が nitric oxide (NO) であることが提唱され、現在では定説となっている。血管内皮細胞の機能としては、血流の調節、血小板凝集・粘着阻害、物質透過性の調節、血管弾力性の維持が挙げられる。特に、EDRFの作用は、血管拡張作用だけではなく血小板の凝集・粘着をも調節していることから、動脈硬化等の循環器系合併症と密接に関係していると考えられている。そこで本章では、糖尿病時における血管内皮細胞の機能変化に着目し、AChによる内皮細胞依存血管弛緩反応を検討し、さらに血管中 cyclic nucleotide 量についても併せて検討した。

<実験方法>

1) 使用動物および実験的糖尿病動物の作製法

実験には、雄性 Wistar ラット 8週齢、体重 200-220 gを用いた。糖尿病群には、pH 4.5のクエン酸緩衝液に溶解した 60 mg/kg STZ を尾静脈より投与し、実験的糖尿病を誘発した。また、対照群には、溶媒のクエン酸緩衝液のみを静脈内投与した。その後、飲料水および餌は、自由に摂取させ、STZ または溶媒投与の 8-10 週後に実験に用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は調製後、95 % O₂-5 % CO₂の混合ガスを常時通気し、37 °Cに保温した。

3) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

STZ または溶媒投与の 8-10 週間後に、ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本を作製した。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-611T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °Cに保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間ブレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を 10^{-7} M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、 10^{-5} M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10^{-5} M) による弛緩反応が、NE (10^{-7} M) に対して、85% 以上認められる場合を、内皮細胞存在群と見なし、実験を行なった。薬物を洗浄した 40 分後に、equieffective な濃度の NE (3×10^{-8} - 10^{-7} M) で血管を収縮させ、反応が安定した後に、ACh (10^{-8} - 10^{-5} M)、sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9} - 10^{-6} M) または、atrial natriuretic peptide (ANP, 10^{-9} - 10^{-6} M) を累積的に投与し、血管弛緩反応を検討した。

5) Cyclic nucleotides 量の測定

血管中 cyclic GMP および cyclic AMP の定量は、radioimmunoassay 法にて行なった。糖尿病誘発後 8-10 週間後に、ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。その後、すばやく胸部大動脈を摘出し、95 % O_2 -5 % CO_2 の混合ガスを通気した栄養液に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、血管を 5 ml の栄養液が入った試験管に移し、37 °C に保温して、95 % O_2 -5 % CO_2 の混合ガスを通気しながら、60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、 10^{-7} M NE を添加して 10 分間インキュベーションした。ACh の影響を検討する場合には、さらに 10^{-5} M ACh を添加して、1 分後に液体窒素にて凍結した。凍結した標本をポリトロンホモジナイザー (Polytron Kinematica) を用いて、6% trichloroacetic acid 1 ml を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3000 g, 4 °C, 10 min) 後、上清を分取した。上清を水飽和 ether で 4 回洗浄して、trichloroacetic acid を除去した。以上のように調製したサンプル中の cyclic GMP および cyclic AMP を radioimmunoassay 法にて定量した。血管標本の蛋白量は、Lowry ら⁶²⁾ の方法で定量し、cyclic GMP および cyclic AMP 量を蛋白量で補正して算出した。

6) 血糖値の測定

採血する際には、非絶食下の午前中に行い、血糖値の測定は o-toluidine 法²⁹⁾で行なった。

7) 使用薬物

streptozotocin (Sigma)

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

sodium nitroprusside (Sigma)

atrial natriuretic peptide (ペプチド研究所)

acetylcholine chloride (第一製薬)

cyclic GMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

cyclic AMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

8) データの解析

血管弛緩作用は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は、NE による収縮を、50 % 抑制する血管弛緩薬の濃度として示した。各データは、mean \pm S.E. で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) 対照群および糖尿病群における体重および血糖値

クエン酸緩衝液を投与した対照群の 8-10 週間後の体重および血糖値はそれぞれ 453.0 ± 9.9 g (n=20) および 113.6 ± 2.9 mg/dl (n=20) であった。一方、STZ 投与群における 8 週間後の体重および血糖値はそれぞれ 277.0 ± 11.0 g (n=20) および 755.5 ± 44.0 mg/dl (n=20, $P < 0.01$) であり、糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、STZ 投与群において、血糖値が 300 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

2) ACh, SNP, ANP 誘発血管弛緩反応

ACh は、対照群および糖尿病群のいずれの群においても、NE で収縮させた胸部大動脈を濃度依存的に弛緩させたが、糖尿病群における ACh 誘発内皮細胞依存性血管弛緩反応は、対照群と比較して減弱していた (fig. 4-1)。ACh による血管弛緩反応の IC_{50} 値は、対照群で $4.57 \pm 0.67 \times 10^{-8}$ M (n=6)、糖尿病群で $1.00 \pm 0.87 \times 10^{-7}$ M (n=6, $P < 0.05$) であり、糖尿病群における IC_{50} 値は、有意に増大していた。SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬⁶⁾) および ANP (particulate guanylate cyclase 活性化薬⁶³⁾) は、対照群および糖尿病群いずれの血管においても濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、両群の間には有意な差は認められなかった。 IC_{50} 値は、table 4-1 に示した。

3) cyclic GMP および cyclic AMP 量の変化

血管中の cyclic GMP basal level は、対照群で、 7.46 ± 2.02 pmol / mg protein (n=4)、糖尿病群で、 1.28 ± 0.72 pmol / mg protein (n=4, $P < 0.05$) であり、糖尿病群において有意に低下していた。さらに、NE 処置群および ACh 処置群いずれの場合においても、血管中 cyclic GMP 量は糖尿病群で減少していた (table 4-2)。この時、cyclic AMP の basal level は、両群の間に有意な差は認められなかった (data not shown)。

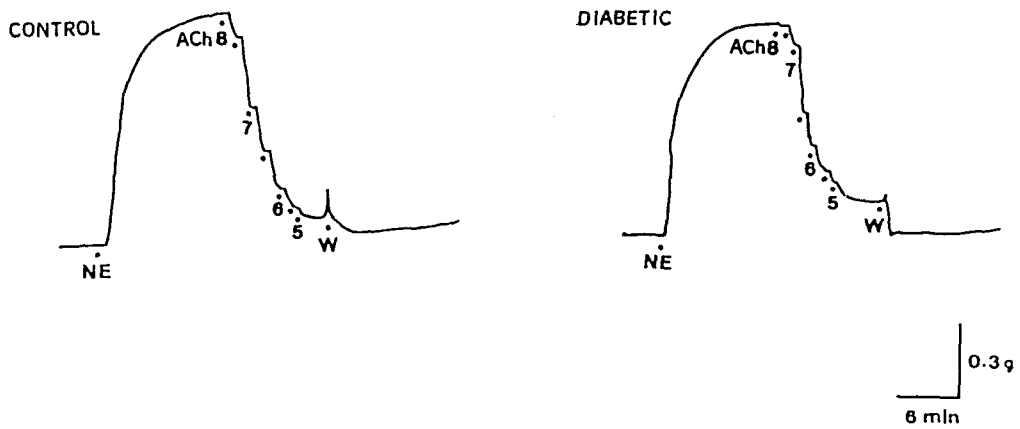


Fig. 4-1 Relaxation responses to acetylcholine (ACh) of aortic strips with endothelium from age-matched control and diabetic rats. The aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M noradrenaline (NA).

Table 4-1 IC₅₀ values for acetylcholine (ACh)-, atrial natriuretic peptide (ANP)- and sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation of aortic strips from age-matched control and diabetic rats

Drugs	Control	Diabetic
ACh	4.57 ± 0.67 x 10 ⁻⁸ M	1.00 ± 0.87 x 10 ⁻⁷ M *
ANP	3.51 ± 0.83 x 10 ⁻⁹ M	4.53 ± 0.69 x 10 ⁻⁹ M
SNP	3.46 ± 0.66 x 10 ⁻⁹ M	4.30 ± 0.60 x 10 ⁻⁹ M

Values are mean ± S.E. n = 6 animals.

* Statistically different from age-matched control (P < 0.05).

Table 4-2 Basal and acetylcholine (ACh)-induced production of cyclic GMP in aortic strips from age-matched control and diabetic rats.

Agents	Control cyclic GMP (pmol / mg protein)	Diabetic cyclic GMP (pmol / mg protein)
None	7.46 ± 2.02	1.28 ± 0.72 *
NE (10 ⁻⁷ M)	7.30 ± 0.58	3.56 ± 1.13 *
NE (10 ⁻⁷ M) + ACh (10 ⁻⁵ M)	43.88 ± 4.50	21.10 ± 1.32 **

Values are mean ± S.E. n= 4 animals.

Significantly different from age-matched control, * P < 0.05, ** P < 0.01.

<考察>

本実験において、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ACh 誘発内皮細胞依存性弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。さらに、ACh による cyclic GMP 生成量も糖尿病群では低下していたことから、糖尿病時には、EDRF (NO) の産生または放出の低下により血管内皮細胞の機能が低下していることが明らかとなった。

今回、ACh による内皮細胞依存性血管弛緩反応は、糖尿病時において減弱していた。この原因の一つとしては、guanylate cyclase 活性の低下が考えられる。この点に関して、SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬⁶¹⁾) および ANP (particulate guanylate cyclase 活性化薬⁶²⁾) による血管弛緩反応を検討したが、両群の間に有意な差は認められなかった。この結果から、血管平滑筋側の guanylate cyclase 活性には両群の間には差はなく、ACh による弛緩反応の減弱は、guanylate cyclase 活性の変化によるものではないことが示唆された。

ACh が、内皮細胞上の muscarinic receptor に結合すると、EDRF (NO) と呼ばれる極めて不安定な物質が放出され、この EDRF (NO) が、平滑筋側で血管中 cyclic GMP 量を増加させて、血管弛緩作用を示すことが明らかとなっている⁵⁸⁻⁶⁰⁾。そこで、本実験において、血管中 cyclic GMP を定量したところ、basal level および ACh 刺激時いずれの場合においても、cyclic GMP 量は糖尿病群で有意に減少していた。以上のことから、糖尿病時における ACh 誘発弛緩反応の減弱は、血管中 cyclic GMP 量とも相関しており、その原因としては、ACh 刺激時の EDRF (NO) の産生または遊離の低下が関与している可能性が考えられた。さらに、糖尿病時には、basal level の血管中 cyclic GMP 量も有意に減少していたことから、内皮細胞から常時遊離されている、EDRF (NO) の量も糖尿病時には少ない可能性が示唆された。糖尿病時における血管内皮細胞の機能に関しては低下⁶⁴⁾、不変⁶⁵⁾、亢進⁶⁶⁾と様々な報告がある。この原因に関しては、現時点では明らかとなっていない。しかし、それまでの報告では、単に血管反応性のみ検討した結果であり、血管中 cyclic GMP を定量したという報告はなく、本実験の結果は、糖尿病時の血管内皮細胞の機能低下をさらに強く示唆するものである。このように I 型糖尿病モデルの STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における血管内皮細胞の機能障害が認められた。血管内皮細胞は nitric oxide (NO) を介して血小板凝集・粘着を抑制する方向に働いているため、このことが糖尿病時に動脈硬化症、脳血管疾患、腎症

等の種々循環器系疾患の原因となっている可能性が示唆された。

第5章 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における内皮細胞依存性血管弛緩反応に及ぼす加齢および血糖値の影響

第4章において、著者は、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ACh 誘発内皮細胞依存性弛緩作用が減弱し、糖尿病時における血管内皮細胞の機能が低下していることを見いだした⁶⁷⁾。自然発症糖尿病ラットに関しては、生後まもなく I 型糖尿病を自然発症する Bio Breeding (BB) ラットを用いた検討から、内皮細胞依存性血管弛緩が減弱することが報告されている^{68, 69)}。一方、血管内皮細胞の機能は加齢によっても低下することが報告されていることから⁷⁰⁾、糖尿病時における内皮機能障害は加齢によって加速される可能性がある。そこで本章では、I 型の糖尿病を自然発症する WBN/Kob ラットの胸部大動脈を用いて、血管内皮細胞の機能に着目して、内皮細胞依存性弛緩作用に及ぼす加齢と血糖値の影響について検討を行なった。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 WBN/Kob ラット 13-15 週齢および 90-92 週齢を用いた。また、対照群にはそれぞれ同週齢の 雄性 Wistar 系ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂の混合ガスを常時通気し、37 °Cに加温した。

3) 血糖値の測定

採血する際には、非絶食下の午前中に行い、血糖値の測定は自動分析装置 (Hitachi 7150) を用いて、glucoseoxidase 法で行なった。

4) 非観血的血圧の測定

ラットの血圧は、実験に供する 1 日前に非観血的無麻酔下血圧測定装置 (KN-210-1, Natsume) によって測定した。血圧はばらつきを考慮し、3 回測定して平均値を求めた。

5) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本を作製した。血管内皮細胞を除去した標本で薬物反応を検討する場合は、綿棒にて内皮細胞を除去した。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用

force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間ブレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は 20 分毎に交換した。

6) 薬物反応性の検討

60-90 分間のブレインキュベーションの後、血管を、10⁻⁷ M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、10⁻⁵ M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10⁻⁵ M) による弛緩反応が、NE (10⁻⁷ M) に対して 70 % 以上認められる場合を、内皮細胞存在標本とみなし、ACh による弛緩反応が全く認められない標本を内皮細胞除去標本として実験を行なった。薬物を洗浄した 40 分後に、3x10⁻⁸-10⁻⁷ M の濃度の NE で血管を収縮させ、反応が安定した後に、ACh (10⁻⁸-10⁻⁵ M)、sodium nitroprusside (SNP, 10⁻¹⁰-10⁻⁷ M) または、atrial natriuretic peptide (ANP, 10⁻¹⁰-10⁻⁷ M) を累積的に投与し、血管弛緩作用を検討した。

7) 血管内皮細胞の電子顕微鏡像

各群より胸部大動脈を摘出し、長さ 5 mm のリング状に切りサンプルとして用いた。標本を、2.5 % glutaraldehyde を含むリン酸緩衝液中 (4°C, 2hr) で固定し、その後、リン酸緩衝液で 20 分おきに 3 回洗浄した。次に 1 % osmium tetroxide を含むリン酸緩衝液で 90 分間固定したあと、10 分おきに 3 回洗浄した。ethanol で段階的に脱水した後、propylene oxide と araldite epoxy resin の混合物に標本を移して一晩室温で固定し、その後、60°C で、24 時間放置した。その後、uranyl acetate および lead acetate で染色して電子顕微鏡用サンプルとした。

8) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

sodium nitroprusside (Sigma)

indomethacin (Sigma)

atrial natriuretic peptide (ペプチド研究所)

acetylcholine chloride (第一製薬)

9) データの解析

血管弛緩反応は NE による収縮力を 100 % とした時の割合を血管弛緩率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は NE による収縮を 50 % 抑制する血管弛緩薬の濃度として示した。各データは、 $mean \pm S.E.$ で表し、有意差検定は Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。

<実験結果>

1) 各動物群における体重、血圧および血糖値

Table 5-1 に各動物群の体重、血圧および血糖値を示した。体重および血圧に関しては、各動物群の間に有意な差は認められなかった。血糖値に関しては、若齢 WBN/Kob ラット(13-15 週齢)では、血糖値の上昇は認められず、高齢 WBN/Kob ラット(90-92 週齢)でのみ血糖値の有意な上昇が認められた。

2) ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用

ACh は若齢対照群においても高齢対照群においても、濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、この弛緩作用は高齢対照群において著明に感受性が低下していたが、最大弛緩反応は若齢対照群と同様であった (fig. 5-1)。一方、WBN/Kob ラットにおいても、ACh は濃度依存的な血管弛緩反応を示し、この弛緩作用は高齢 WBN/Kob 群において ACh に対する感受性は変化せずに、最大弛緩反応が减弱していた。また、若齢 WBN/Kob ラットに関しては若齢対照群と比較すると、ACh に対する感受性が著明に低下していたが、最大弛緩反応は同様であり、その濃度反応曲線は、高齢対照群とほぼ同様であった。さらに、高齢 WBN/Kob ラットに関しては、高齢対照群と比較すると、ACh に対する感受性は変化せずに、最大弛緩反応のみが减弱していた。各群における ACh に対する IC_{50} 値を、table 5-2 に示した。若齢 WBN/Kob 群、高齢対照群および高齢 WBN/Kob 群において、AChによる内皮細胞依存性血管弛緩作用に及ぼす indomethacin (10^{-5} M、cyclooxygenase 阻害薬)の影響を検討したが、AChによる内皮細胞依存性血管弛緩作用は、いずれの群においても、全く影響されなかった (data not shown)。

Table 5-1 Body weight, blood pressure and serum glucose levels

	Young (13-15 week)		Aged (90-92 week)	
	Wistar (n=10)	WBN/Kob (n=10)	Wistar (n=8)	WBN/Kob (n=8)
Body weight (g)	312.1 ± 10.8	335.0 ± 13.5	420.6 ± 23.4	397.0 ± 18.3
Blood pressure (mm Hg)	143.1 ± 8.3	134.4 ± 5.5	158.3 ± 11.9	143.8 ± 9.4
Serum glucose (mg/dl)	123.4 ± 4.1	143.5 ± 12.1	103.3 ± 9.8	336.3 ± 67.0 *

Values are means ± S.E. n, number of animals. * P < 0.01 vs. young WBN/Kob rats.

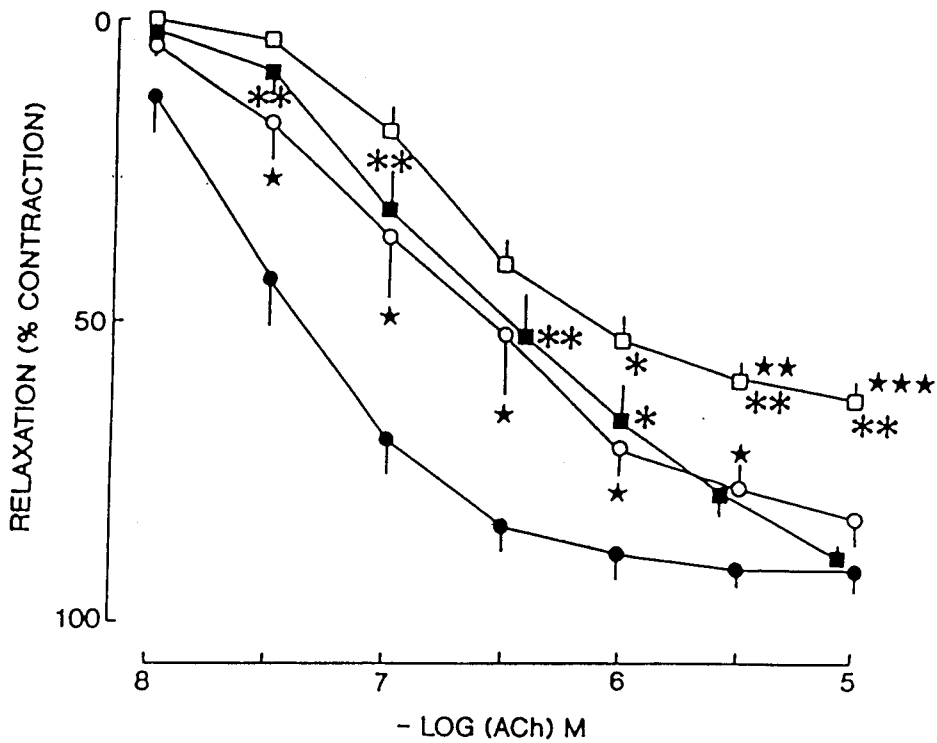


Fig. 5-1 Concentration-response curves for relaxation responses to acetylcholine (ACh) of aortic strips with endothelium from young (●, n=5), and aged (○, n=6) control (Wistar) rats and young (■, n=5) and aged (□, n=6) WBN/Kob rats. Aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M norepinephrine. Results are means \pm S.E. Statistically different from young and aged control rats * P < 0.05, ** P < 0.01. Statistically different from young control and young WBN/Kob rats, ★ P < 0.05, ★★ P < 0.01.

3) SNP および ANP による内皮細胞非依存性血管弛緩作用

SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬¹⁶⁾) は、若齢対照群においても高齢対照群においても、濃度依存的な血管弛緩反応を示した。この弛緩作用は高齢対照群において軽度感受性の亢進が認められたが、最大弛緩反応は若齢対照群と同様であった (fig. 5-2)。一方、WBN/Kob ラットにおいても、SNP は濃度依存的な血管弛緩反応を示し、この弛緩作用は対照群と同様に、高齢 WBN/Kob 群において軽度感受性の亢進が認められたが、最大弛緩反応は若齢群と同様であった (fig. 5-2)。

ANP (particulate guanylate cyclase 活性化薬⁶²⁾) は、いずれの群においても濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、各群の間には有意な差は認められなかった (Fig. 5-2)。SNP および ANP による弛緩反応の IC_{50} 値を table 5-2 に示した。

4) 血管内皮細胞の電子顕微鏡像

若齢 WBN/Kob 群における血管内皮細胞は若齢対照群と比較して差は認められなかった (fig. 5-3 A, B)。一方、高齢対照群および高齢 WBN/Kob 群では、血管内皮細胞の下部の基底膜が肥厚していた (fig. 5-3 C, D)。さらに、高齢 WBN/Kob 群では、内皮細胞と隣接している細胞との細胞間隙が複雑に入り組んでいるのが観察された。

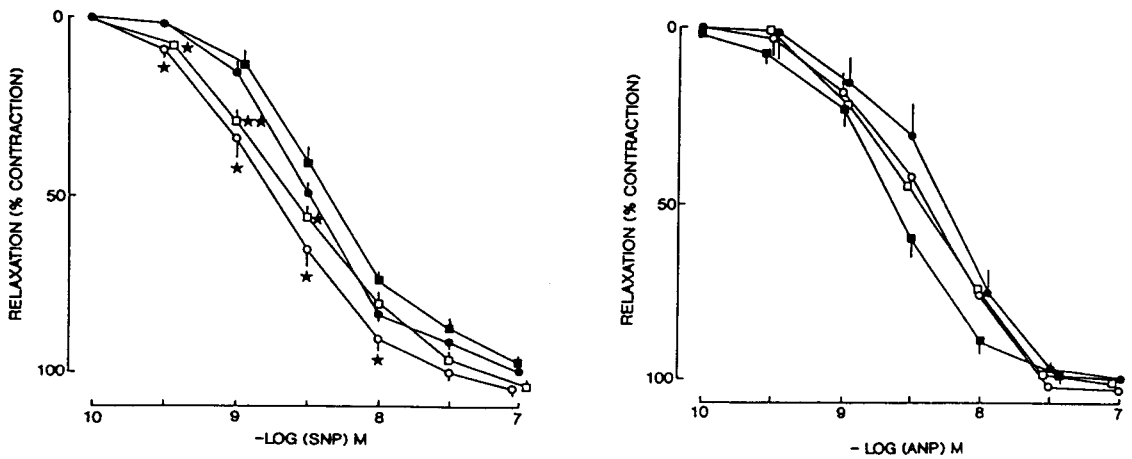


Fig. 5-2 Left: Concentration-response curves for sodium nitroprusside (SNP) with endothelium from young (●, n=5) and aged (○, n=6) control (Wistar) rats and young (■, n=5), and aged (□, n=6) WBN/Kob rats. Aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M norepinephrine (NE). Results are means \pm S.E. Statistically different from young control and young WBN/Kob rats: ★ P < 0.05.

Right: Concentration-response curves for atrial natriuretic peptide (ANP) with endothelium from young (●) and aged (○) control rats and young (■) and aged (□) WBN/Kob rats. Aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M NE. Values are means of results of 4 experiments, respectively, with means \pm S.E. indicated by vertical lines.

Table 5-2 Evaluation of relaxation responses of aortic strips from young and aged Wistar and WBN/Kob rats.

Agent	Young 13-15 week		Aged 90-92 week	
	Wistar	WBN/Kob	Wistar	WBN/Kob
ACh				
Maximal relaxation %	90.7 ± 3.0	89.3 ± 2.2	82.1 ± 4.5	62.5 ± 3.3 § #
IC ₅₀ x10 ⁻⁷ M	0.4 ± 0.1(5)	5.2 ± 2.0 *(5)	2.2 ± 1.0★(6)	2.2 ± 0.4(6)
SNP				
Maximal relaxation %	99.9 ± 1.0	98.5 ± 3.1	105.0 ± 2.5	105.3 ± 3.1
IC ₅₀ x10 ⁻⁹ M	3.3 ± 0.4(5)	4.2 ± 0.4(5)	2.0 ± 0.3★(6)	2.6 ± 0.2★(6)
ANP				
Maximal relaxation %	100.0 ± 0.1	98.8 ± 3.0	103.2 ± 1.1	100.8 ± 0.8
IC ₅₀ x10 ⁻⁹ M	5.3 ± 1.4(4)	2.4 ± 0.4(4)	4.4 ± 0.5(4)	4.3 ± 0.9(6)

Values are means ± S.E. Number of animals are given in parentheses. ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; ANP, atrial natriuretic peptide. * P < 0.05, # P < 0.01 vs. young and aged Wistar rats, respectively. ★ P < 0.05, § P < 0.01 vs. young Wistar and WBN/Kob rats, respectively.

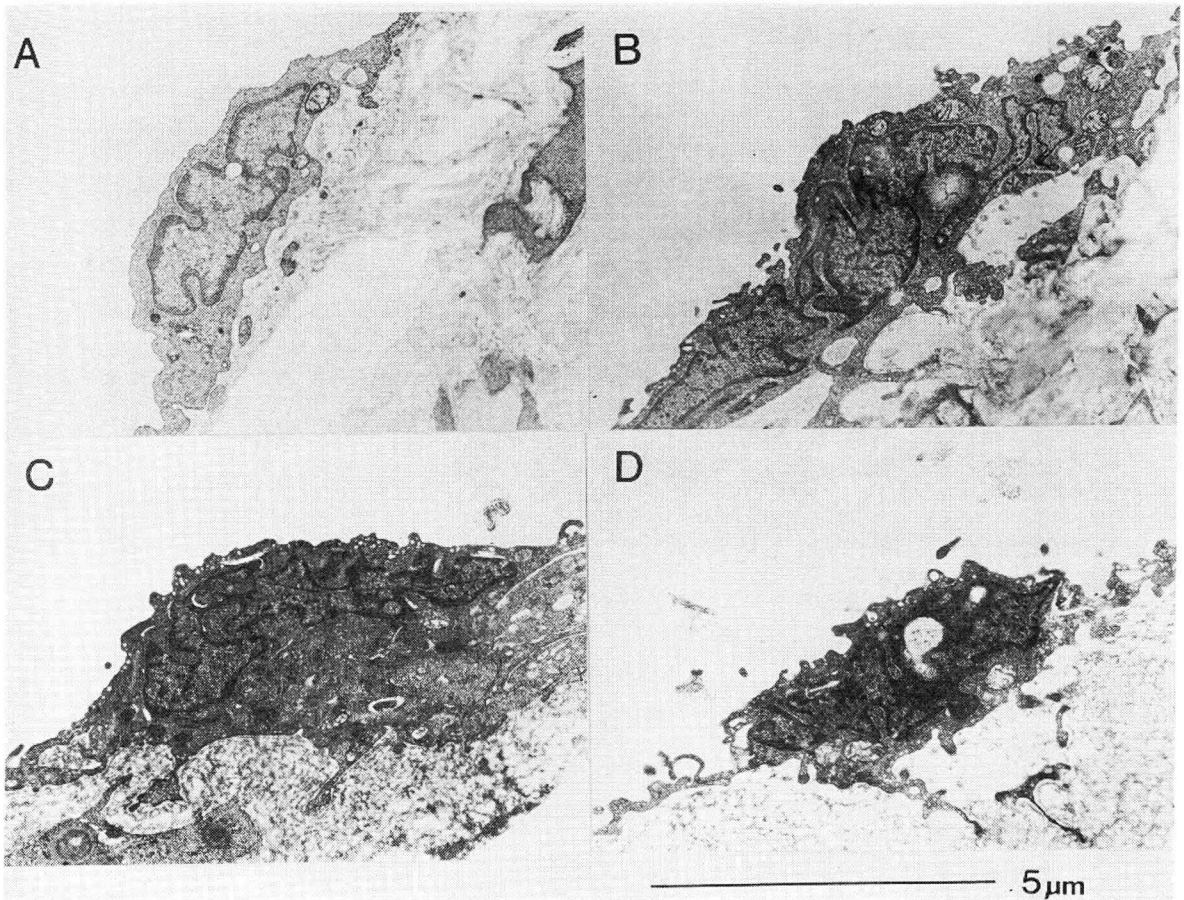


Fig. 5-3 Electron micrograph of aortic endothelial cells. A: young Wistar rat (x10000); B: young WBN/Kob rat (x10000); C: aged Wistar rat (x10000); D: aged WBN/Kob rat (x10000). Each endothelial cell contains an irregularly shaped nucleus and pinocytic vesicles in cytoplasm.

<考察>

本実験から、自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈においても、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。特に、血糖値が上昇していない若齢 WBN/Kob ラット群においても若齢対照群と比較して、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が減弱していたことから、WBN/Kob 群では糖尿病発症以前から、血管内皮細胞の機能が低下していることが示唆された。

対照群および WBN/Kob 群いずれにおいても、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用は、加齢にともない、減弱することが明らかとなった。この結果は、Soltis⁷⁰⁾の報告からも支持されている。一方、SNP による血管弛緩反応は、対照群および WBN/Kob 群いずれにおいても加齢に伴い軽度には増強されていた。この結果は、高齢群における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱が、可溶性 soluble guanylate cyclase 活性の低下に基づくものではないことを示唆している。なぜ、SNP による血管弛緩反応が加齢によって増強されていたのかは不明であるが、高齢群においては長期にわたって、血管内皮細胞の機能が低下しているため、EDRF (NO) の産生減少が起こり、これによって soluble guanylate cyclase の活性が特異的に up-regulate されている可能性が考えられた。ANP による血管弛緩反応は、加齢に伴い影響を受けなかったことから、particulate guanylate cyclase 活性は、加齢により変化しないと考えられる。この結果は、Duckles⁷¹⁾の報告とも一致する。

STZ 誘発糖尿病ラット^{64,72,73)}および alloxan 誘発糖尿病ウサギ^{74,75)}等の化学物質誘発糖尿病動物を用いた検討では、血管内皮細胞依存性弛緩作用が減弱していることが報告されていた。実際、著者も、第4章の検討から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈において ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が減弱していることを見いだしている⁶⁰⁾。自然発症糖尿病ラットを用いた検討では、BB ラットを用いた検討から、胸部大動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応の減弱が報告されている^{68,69)}。この点に関しては、今回の結果もこれらのデータを支持する結果である。しかし、BBラットは生後まもなくから血糖値が上昇し、インスリンを投与し続けなければ生存しない動物であることから、データの解釈には若干の問題を含んでいると思われる。本実験の検討では、血糖値が上昇していない若齢 WBN/Kob ラット群においても若齢対照群と比較して、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が減弱していたことから、WBN/Kob 群では、糖尿病発症以前から、血管内皮細胞の機能が遺伝的に低下していることが示唆された。WBN/Kob 群における SNP および ANP による血管弛緩

反応は同週齢の対照群との間にそれぞれ差がなかったことから、WBN/Kob 群における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱は、guanylate cyclase 活性の変化に起因していないことが示唆された。

近年、STZ 誘発糖尿病ラットの脳微小動脈⁷⁶⁾ および alloxan 誘発糖尿病ウサギの胸部大動脈⁷⁷⁾における内皮細胞依存性血管弛緩反応の減弱が、indomethacin (cyclooxygenase 阻害薬) や SQ 29548 (prostaglandin H₂ - thromboxane A₂ 受容体拮抗薬) の処置により改善されることが報告された。このことは、ACh の刺激により血管内皮細胞から、EDRF (NO) および血管収縮性の prostanoids が放出されたため、見かけ上 ACh による内皮依存性血管弛緩作用が減弱しているという報告である。本実験においては、若齢 WBN/Kob ラット群、高齢対照群および高齢 WBN/Kob 群に認められた ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱は、indomethacin の処置により、影響を受けなかったことから、収縮性 prostanoids の産生よりは、内皮細胞からの EDRF (NO) の産生または遊離の低下に起因することが考えられた。

また、血管内皮細胞の電子顕微鏡写真撮影の結果から、若齢 WBN/Kob 群における血管内皮細胞は若齢対照群と比較して差は認められなかったことから、若齢 WBN/Kob ラットにおいては内皮細胞の機能のみが障害され、組織学的には異常がないことが明らかとなった。一方、高齢対照群および高齢 WBN/Kob ラット群では、電顕像からも基底膜の肥厚等が認められ、機能的にも組織学的にも障害されていることが明らかとなった。以上のことから、自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットの胸部大動脈においても、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱が認められ、STZ 誘発糖尿病ラットと同様に血管内皮細胞の機能が低下していることが明らかとなった。

第6章 自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応の減弱

第4章において、著者は、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ACh 誘発内皮細胞依存性弛緩作用が減弱し、糖尿病時における血管内皮細胞の機能が低下していることを見いだした⁶⁷⁾。さらに、第5章での検討から、自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットの胸部大動脈においても、内皮細胞依存性血管弛緩作用が減弱していることを見だし、特に、血糖値が上昇していない若齢 WBN/Kob ラット群においても若齢対照群と比較して、内皮細胞依存性血管弛緩作用が減弱していたことから、WBN/Kob 群では糖尿病発症以前から、血管内皮細胞の機能が低下していることを見いだした⁷⁸⁾。以前までには、著者の報告に見られるように糖尿病時における血管内皮細胞の機能障害に関する報告の多くは、胸部大動脈等の大血管を用いた検討であり、特に自然発症糖尿病ラットに関しても胸部大動脈を用いた報告が認められるが^{68, 69)}、より管腔の細い動脈を用いた検討はない。そこで、本章では、自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈における内皮細胞の機能変化を検討し、I型糖尿病モデルである WBN/Kob ラットの胸部大動脈で認められた、血管内皮細胞の機能障害がより管腔の小さい上腸間膜動脈でも認めらるかどうか検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 WBN/Kob ラット80-90 週齢および対照群として同週齢の Wistar 系ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は調製後、95 % O₂-5 % CO₂の混合ガスを常時通気し、37 °Cに保温した。

3) ラット上腸間膜動脈リング状標本の作製

ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は血糖値測定用に採取した。上腸間膜動脈（外径約 1 mm、長さ約 7-8 mm）を摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液の中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3-4 mm のリング状標本作製した。このリング状標本を、標本固定用のステンレス線（外径 0.2 mm）に装着した。ステンレス線の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °Cに保温した。標本には、

1.5 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は 20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、 3×10^{-7} M の濃度の NE で血管を収縮させ、反応が安定した後に、ACh (10^{-8} - 10^{-5} M)、sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9} - 10^{-6} M) または A 23187

(3×10^{-7} M) を投与し、血管弛緩反応を検討した。尚、ACh および SNP は累積投与で行ない、A 23187 は単回投与で行なった。また、ACh 誘発血管弛緩作用に及ぼす indomethacin (5×10^{-6} M) の影響を検討する際は、indomethacin を NE 投与 15 分前に前処置して検討した。

5) 血糖値の測定

採血する際には、非絶食下の午前中に行い、血糖値の測定は自動分析装置 (Hitachi 7150) を用いて、glucoseoxidase 法で行なった。

6) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

sodium nitroprusside (Sigma)

indomethacin (Sigma)

calcimycin (A23187, Calbiochem)

acetylcholine chloride (第一製薬)

7) データの解析

血管弛緩反応は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は、NE による収縮を 50 % 抑制する血管弛緩薬の濃度として示した。各データは、mean \pm S.E. で表し、有意差検定は、Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。また、2 群間の比較には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) 対照群および WBN/Kob ラット群における体重および血糖値

対照群における体重および血糖値は、 475.5 ± 9.3 g (n=15) および 108.4 ± 8.7 mg/dl (n=15) であった。一方、WBN/Kob ラット群における体重および血糖値は、 395.8 ± 6.2 g (n=15) および 376.4 ± 55.0 mg/dl (n=15, $P < 0.01$) であり、糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、WBN/Kob ラット群において、血糖値が 200 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

2) ACh 誘発血管弛緩反応

各薬物による弛緩反応を検討する際の NE (3×10^{-7} M) 誘発血管収縮作用は、対照群および糖尿病群の間には有意な差は認められなかった (data not shown)。

ACh は対照群および糖尿病群のいずれの群においても、NE で収縮させた上腸間膜動脈を濃度依存的に弛緩させたが、糖尿病群における ACh 誘発内皮細胞依存性血管弛緩反応は、対照群と比較して有意に減弱していた (fig. 6-1)。ACh による血管弛緩反応に対する indomethacin (5×10^{-6} M、cyclooxygenase 阻害薬) の影響を検討した結果、対照群、糖尿病群いずれの群においても、濃度反応曲線は左方にシフトし、弛緩反応の反応性亢進が認められた。

3) A 23187 および SNP 誘発血管弛緩反応

A 23187 (3×10^{-7} M, Ca^{2+} ionophore) による内皮細胞依存性弛緩反応は、ACh と同様に糖尿病群において有意に減弱していた。A 23187 (3×10^{-7} M) による血管弛緩反応は、対照群で 71.8 ± 5.4 % (n=5) および糖尿病群で 42.2 ± 6.3 % (n=5, $P < 0.01$) であった。一方、内皮細胞非依存性の血管弛緩反応を示す SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬¹⁶⁾) は、対照群および糖尿病群いずれの血管においても濃度依存的な血管弛緩作用を示したが、両群の間には有意な差は認められなかった (fig. 6-2)。

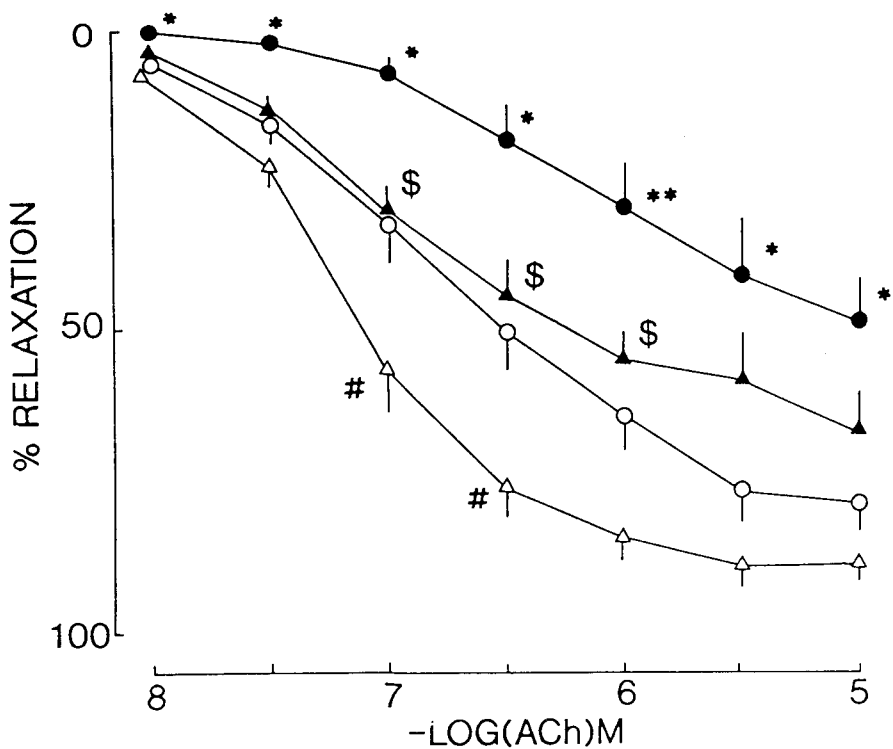


Fig. 6-1 Concentration-response curves for the relaxation responses to acetylcholine (ACh) of mesenteric arteries with endothelium from age-matched Wistar rats (Δ and \circ , in the presence and absence of indomethacin) and WBN/Kob rats (\blacktriangle and \bullet in the presence and absence of indomethacin). The mesenteric arteries were precontracted with 3×10^{-7} M norepinephrine. To examine the effects of indomethacin, the mesenteric arteries were treated with indomethacin for 15 min and then the strips were precontracted with 3×10^{-7} M norepinephrine. Values are the mean of 5 experiments, with SE indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P, 0.01$ for WBN/Kob rats without indomethacin, # $P < 0.05$ for age-matched Wistar rats with indomethacin vs. age-matched Wistar rats without indomethacin; \$ $P < 0.05$ vs. age-matched Wistar rats with indomethacin.

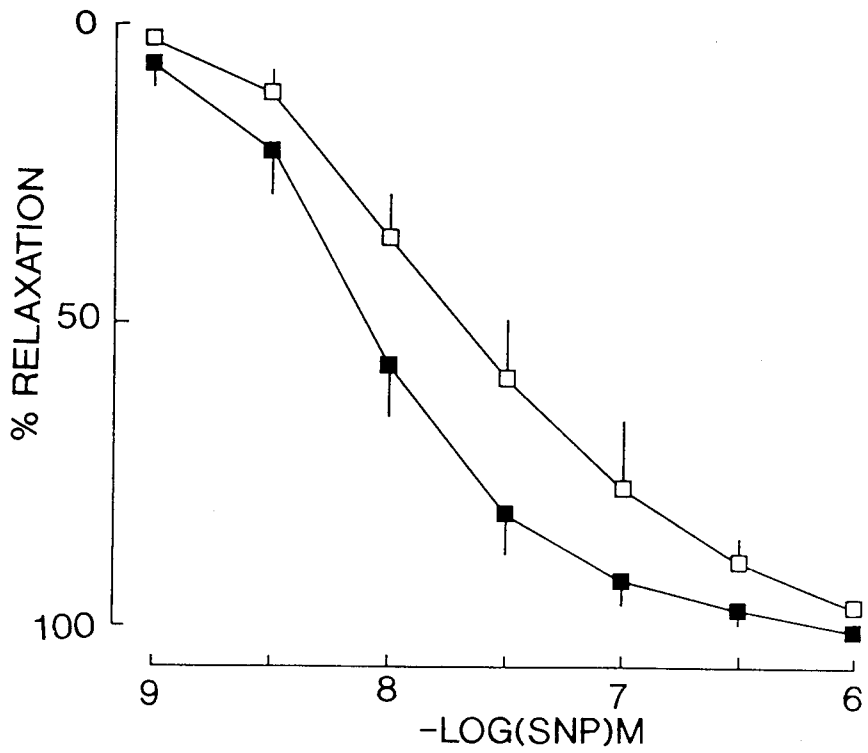


Fig. 6-2 Relaxation responses to sodium nitroprusside (SNP) of mesenteric arteries with endothelium from age-matched Wistar (□) and WBN/Kob (■) rats. Values are the mean of 5 experiments, respectively with S. E. indicated by vertical lines.

<考察>

本実験から、自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈においても、ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。第5章での結果と考え合わせると胸部大動脈で観察された ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用はより管腔の小さい動脈においても認められることが明らかとなった。

ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用は糖尿病群において減弱していた。また、cyclooxygenase 阻害薬である indomethacin 前処置後の ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用を検討したところ、対照群および糖尿病群いずれの群においても、ACh の濃度反応曲線は左方にシフトし、作用の増強が認められた。STZ 誘発糖尿病ラットの脳微小動脈⁷⁶⁾ および alloxan 誘発糖尿病ウサギの胸部大動脈⁷⁷⁾ における内皮細胞依存性血管拡張作用の減弱が、indomethacin (cyclooxygenase 阻害薬) や SQ 29548 (prostaglandin H₂ - thromboxane A₂ 受容体拮抗薬) の処置により拮抗されることが報告された。これらの報告と本実験の結果を考えあわせると、対照群および糖尿病群いずれの群においても、ACh の刺激によって血管内皮細胞から、EDRF (NO) と同時に血管収縮性の prostanoids が放出されている可能性が示唆された。しかし、病態動物においては ACh 刺激により、収縮性の prostanoids が放出される例は他にも報告されているが⁷⁹⁾、正常動物の血管では極めて希である。今回用いている動物の週齢は、80-90 週齢と高齢であるため、このことが、prostanoids 放出の一部関与している可能性も考えられた。Indomethacin 前処置後の ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用においても、対照群と糖尿病群の間には依然として有意な差が認められたことから、糖尿病時における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱は、EDRF (NO) の産生または放出の減少に基づいているものと考えられた。また、糖尿病群における SNP による血管弛緩反応は対照群との間に有意な差が認められなかったことから、糖尿病群における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱は、guanylate cyclase 活性の変化に起因していないことがさらに示唆された。以上のように、自然発症糖尿病ラットである WBN/Kob ラットでは胸部大動脈のような大血管においても、腸間膜動脈のようなより管腔の小さい動脈においても内皮細胞依存性血管弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。

第7章 脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の頸動脈における血管内皮細胞依存性弛緩反応および血管中 cyclic GMP 量の変化

第4章から6章までの検討の結果、糖尿病時には、血管内皮細胞の機能が低下することが明らかとなった^{67,78,80}。糖尿病時には、様々な合併症を伴うことが知られており、特に高血圧症⁸¹や脳卒中などの脳血管疾患⁶⁻⁸も高頻度に合併することが報告されている。高血圧症動物においては糖尿病時と同様に胸部大動脈などの大血管においてその機能が低下することが報告されているが^{79,82,83}、より管腔の小さい動脈に関しては報告が少ない。

SHRSPは、青木、岡本らによって開発された高血圧自然発症ラット (SHR) の中から、さらに血圧が高く脳卒中を高頻度に発症するラットを掛け合わせて開発された病態モデルで、生後52週間後には脳卒中などの合併症により全例死亡するという系である。そこで本章では、高血圧症時における血管内皮細胞の機能変化を検討する目的で、SHRSPの頸動脈における内皮細胞依存性血管弛緩作用および cyclic GMP 量の変化を検討した。尚、本章では脳循環を多少反映すると考えられる頸動脈を用いた。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 SHRSP ラット13-15 週齢および対照群として同週齢の Wistar-Kyoto ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) 非観血的血圧の測定

ラットの血圧は、実験に供する1日前に非観血的無麻酔下血圧測定装置 (KN-210-1, Natsume) によって測定した。血圧はばらつきを考慮し、3回測定して平均値を求めた。

4) ラット頸動脈リング状標本の作製

ラットの頭部を殴打し、右総頸動脈からの脱血により致死させた。左総頸動脈 (外径約 1 mm、長さ約 10 mm) を摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 2.5 mm のリング状標本を作製した。このリング状標本を、標本固定用のステンレス線 (外径 0.2 mm) に装着した。ステンレス線の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1.0 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は20分毎に交換した。

5) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を 10^{-7} M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、 10^{-5} M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10^{-5} M) による弛緩反応が、NE (10^{-7} M) に対して、75% 以上認められる場合を、内皮細胞存在群と見なし、実験を行なった。 10^{-7} M の濃度の NE で血管を収縮させ、反応が安定した後に、ACh (10^{-8} - 10^{-5} M)、sodium nitroprusside (SNP, 10^{-10} - 10^{-6} M)、8-Br-cyclic GMP (10^{-6} - 10^{-4} M), A 23187 (3×10^{-7} M) または melittin (10^{-5} g/ml, phospholipase A₂ 活性化薬) を投与し血管拡張作用を検討した。尚、ACh、SNP、および 8-Br-cyclic GMP は累積投与で行ない、A 23187 および melittin は単回投与で行なった。

6) 血管中 cyclic GMP 量の測定

血管中 cyclic GMP の定量は、radioimmunoassay 法にて行なった。WKY および SHRSP の頭部を殴打し、右総頸動脈からの脱血により致死させ、左総頸動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液の中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。この時各血管における湿重量を測定した。その後、血管を 5 ml の栄養液が入った試験管に移し、37 °C に保温して、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気しながら、60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、 10^{-7} M NE を添加して 10 分間インキュベーションした。ACh の影響を検討する場合には、さらに 3×10^{-7} M ACh を添加して、1 分後に液体窒素にて凍結した。凍結した標本をポリトロンホモジナイザー (Polytron Kinematica) を用いて、6% trichloroacetic acid 1 ml を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3000 g, 4 °C, 10 min) 後、上清を分取した。上清を水飽和 ether で 4 回洗浄して、trichloroacetic acid を除去した。以上のように調製したサンプル中の cyclic GMP を radioimmunoassay 法にて定量した。血管中 cyclic GMP 量は、血管の湿重量当りに補正し表した。

6) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

sodium nitroprusside (Sigma)

calcimycin (A23187, Calbiochem)

melittin (Sigma)

indomethacin (Sigma)

8-Br-cyclic GMP (Sigma)

acetylcholine chloride (第一製薬)

cyclic GMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

7) データの解析

血管弛緩作用は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC₅₀) は、NE による収縮を、50 % 抑制する血管弛緩薬の濃度として示した。各データは mean ± S. E. で表し、有意差検定は Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。また、2 群間の比較には Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) WKY 群および SHRSP 群における血圧

WKY 群および SHRSP 群における収縮期血圧は、 131.6 ± 1.4 mm Hg (n=15) および 256.6 ± 3.4 mm Hg (n=15, $P < 0.01$) と SHRSP 群において著明な血圧の上昇が認められた。

2) ACh、A 23187 および melittin 誘発内皮依存性血管弛緩作用

ACh は、WKY 群および SHRSP 群のいずれにおいても、NE で収縮させた頸動脈を濃度依存的に弛緩させたが、SHRSP 群における ACh 誘発内皮細胞依存性血管弛緩反応は、WKY 群と比較して有意に減弱していた (fig. 7-1)。SHRSP 群において ACh による血管弛緩反応に対する indomethacin (3×10^{-7} M、cyclooxygenase 阻害薬) の影響を検討した結果、indomethacin の前処置は ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用には全く影響を及ぼさなかった。また、A 23187 (3×10^{-7} M) および melittin (10^{-5} g/ml) による内皮細胞依存性血管弛緩反応も同様に、SHRSP 群において有意に減弱していた (fig. 7-2)。

3) SNP および 8-Br-cyclic GMP による内皮細胞非依存性血管弛緩作用

SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬) および 8-Br-cyclic GMP (cyclic GMP analog) は、WKY 群 および SHRSP 群いずれの血管においても濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、両群の間には有意な差は認められなかった (fig. 7-3)。各弛緩薬に対する IC_{50} を、table 7-1 に示した。

4) 血管中 cyclic GMP 量の変化

頸動脈における cyclic GMP basal level は WKY 群で、 536.0 ± 110.0 pmol/g tissue (n=5)、SHRSP 群で 502.4 ± 22.9 pmol/g tissue (n=5) であった。また、NE 処置時には、両群の間に有意な差は認められなかったが、ACh 処置により、血管中 cyclic GMP は、各群とも上昇した。この時の血管中 cyclic GMP 生成量は、SHRSP 群 で有意な低下が認められた。(table 7-2)。

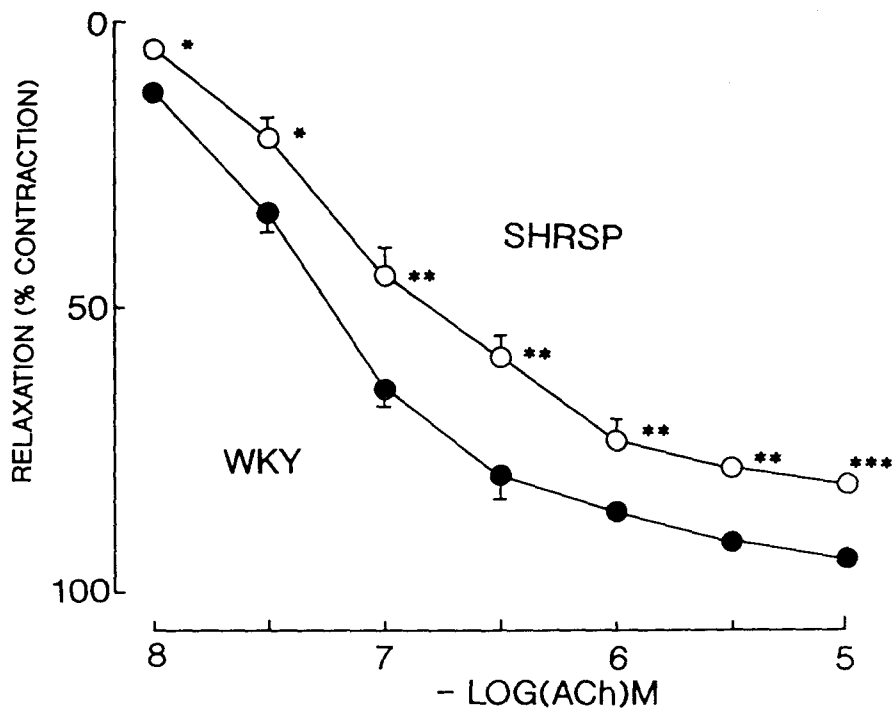


Fig. 7-1 Concentration-response curves for the relaxation response to acetylcholine of carotid arteries with endothelium from WKY (●) and SHRSP (○). The arteries were precontracted with 10^{-7} M norepinephrine. Values represent the means of 6 experiments, respectively with the S.E. values indicated by lines * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

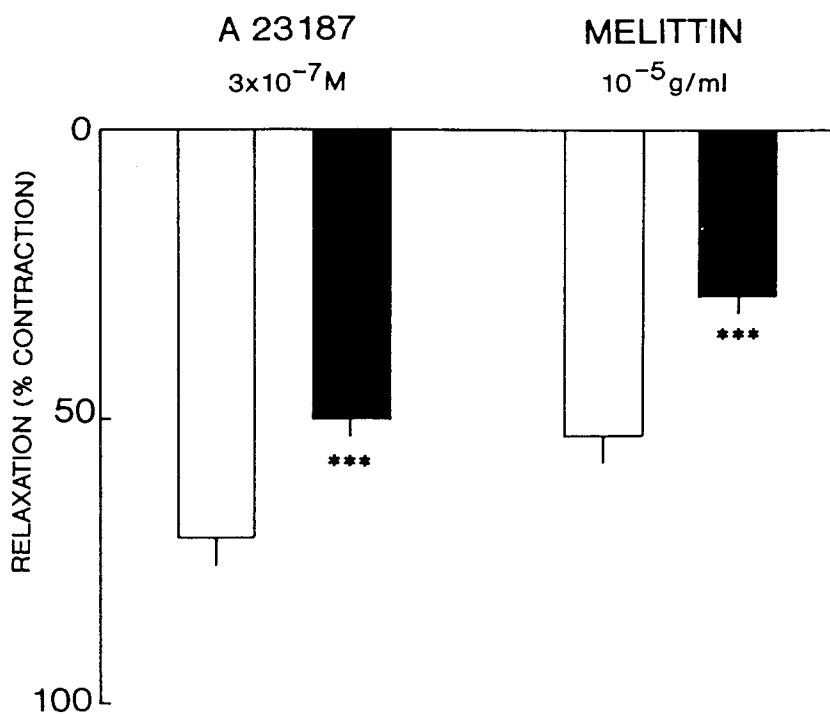


Fig. 7-2 Relaxation responses to A 23187 and melittin of carotid arteries with endothelium from WKY (□) and SHRSP (■). The carotid arteries were precontracted with 10^{-7} M norepinephrine. Values represent the means of 6 experiments, respectively with the S.E. values indicated by lines. *** P < 0.001.

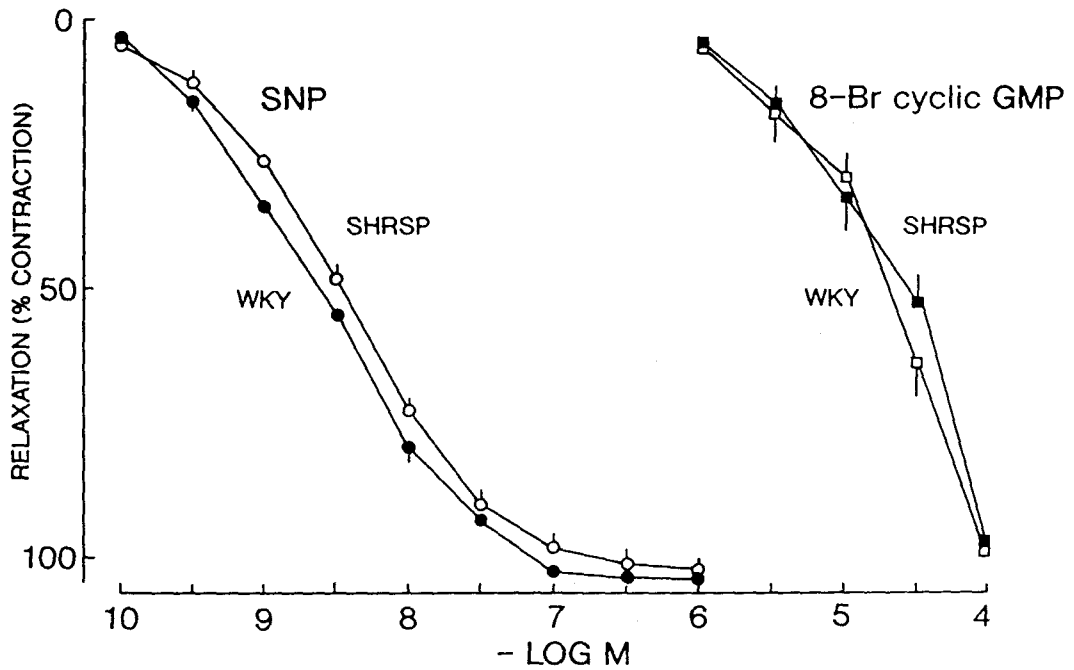


Fig. 7-3 Concentration-response curves for the relaxation responses to sodium nitroprusside (SNP) of carotid arteries with endothelium from WKY (●) and SHRSP (○). Concentration-response curves for the relaxation responses to 8-Br-cyclic GMP of carotid arteries with endothelium from WKY (■) and SHRSP (□). The arteries were precontracted with 10^{-7} M norepinephrine. Values represent the means of 6 experiments, respectively with the S.E. values indicated by lines.

Table 7-1 IC₅₀ values for acetylcholine (ACh)-, sodium nitroprusside (SNP)- and 8-Br-cyclic GMP-induced relaxation of carotid arteries from WKY and SHRSP.

Drugs	WKY (n=6)	SHRSP (n=6)
ACh	5.11 ± 0.54 x 10 ⁻⁸ M	1.40 ± 0.19 x 10 ⁻⁷ M **
SNP	2.35 ± 0.37 x 10 ⁻⁹ M	3.63 ± 0.61 x 10 ⁻⁹ M
8-Br-cyclic GMP	1.82 ± 0.30 x 10 ⁻⁵ M	1.54 ± 0.26 x 10 ⁻⁵ M

Values are means ± S.E., n= number of animals.

** P < 0.01 compared with age-matched WKY.

Table 7-2 Basal and norepinephrine (NE)-treated and/or acetylcholine (ACh)-induced production of cyclic GMP in carotid arteries from WKY and SHRSP.

Agents	WKY	SHRSP
	cyclic GMP pmol / g tissue	cyclic GMP pmol / g tissue
None	536.0 ± 110.0 (5)	502.4 ± 22.9 (5)
NE 10 ⁻⁷ M	284.3 ± 49.3 (5)	249.9 ± 30.4 (5)
NE 10 ⁻⁷ M + ACh 3x10 ⁻⁷ M	2246.5 ± 221.4 (12)	1002.4 ± 259.3 ** (12)

** P < 0.01 compared with WKY. Numbers in parentheses are the number of animals.

<考察>

本章での検討から、SHRSP 頸動脈における内皮細胞依存性血管弛緩反応の減弱が認められた。さらに、ACh による cyclic GMP 生成量も SHRSP 群では低下していたことから、高血圧症時には糖尿病時と同様に血管内皮細胞の機能が低下し、EDRF (NO) の産生または放出等が障害されていることが明らかとなった。

ACh による内皮細胞依存性血管弛緩反応は、高血圧症時において減弱していた。さらに、受容体を介さずに、内皮細胞内への Ca の流入によって内皮細胞依存性血管弛緩反応を示す A 23187、および phospholipase A₂ を活性化し、arachidonic acid を切り出して内皮依存性血管弛緩作用を起こす melittin^{84,85)} による弛緩作用はいずれも高血圧症群においてその弛緩反応は低下していた。以上のことから、内皮依存性血管弛緩反応は ACh だけではなく、他の薬物による内皮依存性弛緩作用も障害されていることが明らかとなった。近年、SHR の胸部大動脈における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用が、indomethacin により改善されることから、ACh 刺激により血管内皮細胞から、血管収縮性の prostanoids が放出されていることが報告された⁷⁹⁾。しかし、本実験では SHRSP 群において、indomethacin は ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用に全く影響を及ぼさなかったことから、SHRSP 群における ACh 誘発内皮依存性血管弛緩作用の減弱には、収縮性の prostanoids は関与していないものと考えられた。

一方、SNP (soluble guanylate cyclase 活性化薬) および 8-Br-cyclic GMP (cyclic GMP analog) による血管弛緩反応を検討した結果、両群の間に有意な差は認められなかった。この結果から、血管平滑筋側の guanylate cyclase 活性または、cyclic GMP に対する感受性には両群の間に差がないことが示唆された。ACh が内皮細胞上の muscarinic 受容体に結合すると、EDRF (NO) が産生、放出され、この EDRF (NO) が平滑筋側で血管中 cyclic GMP 量を増加させて、血管弛緩作用を示すことが明らかとなっている。そこで、本実験において、血管中 cyclic GMP を定量したところ、basal level には変化がなかったが、ACh 刺激時における cyclic GMP 生成量は SHRSP 群において有意に減少していた。以上のことから、高血圧症時における ACh 誘発弛緩反応の減弱は、血管中 cyclic GMP 量とも相関しており、その原因としては、ACh 刺激時の EDRF (NO) の産生または遊離の低下が関与している可能性が考えられたが、その原因は、未だ不明である。このような高血圧症時における血管内皮細胞機能変化に関しては、胸部大動脈などの大血管では報告さ

れていたが^{79,82,83)}、より管腔の小さい動脈を用いて血管中 cyclic GMP を定量している報告はなく、本実験の結果は高血圧症時の血管内皮細胞の機能低下をさらに強く示唆するものである。また、本実験の結果から高血圧症ラット血管においては血管の部位に関わらず、血管内皮細胞の機能が低下していることが明らかとなった。

以上、第4－7章までの検討の結果、以下のことが明らかとなった。

- 1) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における内皮依存性血管弛緩反応の減弱
- 2) 自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における内皮依存性血管弛緩反応の減弱
- 3) 自然発症糖尿病ラットの上腸間膜動脈における内皮依存性血管弛緩反応の減弱
- 4) SHRSP の頸動脈における内皮依存性血管弛緩反応の減弱

特に、EDRF (NO) の作用は、血管弛緩作用だけではなく血小板の凝集・粘着、平滑筋増殖抑制等も調節していることから、動脈硬化、脳血管疾患、腎症等の循環器系合併症と密接に関係していると考えられている。従って、血管内皮細胞の機能低下が、糖尿病時および高血圧症時における種々の合併症に関与していることが推察された。

第8章 SHRSP の門脈平滑筋における protein kinase C 介在性血管収縮反応

近年、血管平滑筋における norepinephrine, angiotensin II, endothelin などの agonist による血管収縮機構においては、phosphatidylinositol (PI) 代謝回転が重要な役割を演じていることが報告されている^{32, 33)}。血管収縮薬が受容体に結合すると細胞膜のリン脂質である PI が加水分解され、inositol trisphosphate (IP₃) および diacylglycerol (DG) が生成される³⁴⁻³⁶⁾。この DG は protein kinase C (PKC) を活性化し、血管収縮を惹起すると考えられており、また、phorbol ester はこの PKC を外因性に活性化することが知られている⁸⁶⁻⁸⁷⁾。現在までに、高血圧症ラットの動脈平滑筋においては、腸間膜動脈を用いた検討から、phorbol ester 誘発血管収縮反応が高血圧症時に増強していることが報告されている^{88, 89)}が、静脈平滑筋における報告はない。そこで本章では、SHRSP の静脈平滑筋における PKC の機能を調べる目的で、SHRSP の門脈平滑筋を用いて、phorbol ester 誘発収縮反応を WKY と比較検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 SHRSP ラット42-46 週齢および対照群として同週齢の Wistar-Kyoto ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) 非観血的血圧の測定

ラットの血圧は、実験に供する 1 日前に非観血的無麻酔下血圧測定装置 (KN-210-1, Natsume) によって測定した。血圧はばらつきを考慮し、3 回測定して平均値を求めた。

4) ラット門脈平滑筋筒状標本の作製

ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。門脈を摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 8 mm の筒状標本を作製した。このリング状標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、縦走筋方向の等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、0.5 g の静止張力を負荷して、40 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20分毎に交換した。

5) 薬物反応性の検討

40 分間のインキュベーションの後、phorbol 12,13 dibutyrate (PDBu, 10⁻⁹-10⁻⁶ M) を累積投与して血管収縮反応を検討した。PDBu 誘発収縮に対する staurosporine (10⁻⁹ M, protein

kinase C 阻害薬) および nifedipine (3×10^{-6} M, 膜電位依存性 Ca^{2+} -channel 阻害薬)の影響を検討する際には、これらの薬物を 15 分間前処置した後 PDBu を累積投与した。また、 Ca^{2+} -free 液下で、PDBu 誘発収縮を検討する際には、1 mM EGTA を含む Ca^{2+} -free の栄養液に交換した15 分後に、PDBu を累積投与した。

6) 使用薬物

phorbol 12, 13 dibutyrate (Sigma)

nifedipine hydrochloride (Sigma)

staurosporine (協和発酵)

7) データの解析

血管の発生張力は mg で示した。各データは mean \pm S.E. で表し、有意差検定は、Bartlett検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Scheffe 検定で有意差を検定した。

<実験結果>

1) WKY 群および SHRSP 群における血圧

WKY 群およびSHRSP 群における収縮期血圧は、 121.7 ± 3.0 mm Hg (n=20) および 221.5 ± 9.2 mm Hg (n=20, $P < 0.01$) と SHRSP 群において著明な血圧の上昇が認められた。

2) 静止時における門脈平滑筋の律動性自発収縮

静止時における門脈平滑筋の律動性自発収縮は、SHRSP 群において有意に増強されていた。WKY 群 および SHRSP 群の律動性自発収縮の発生張力は、 220 ± 70 mg (n=5)、 520 ± 20 mg (n=5, $P < 0.05$) であった。

3) PDBu 誘発血管収縮反応

PDBu は、WKY 群および SHRSP 群のいずれの門脈平滑筋においても、濃度依存的に収縮頻度および自発収縮を増強した (fig. 8-1, 8-2)。WKY 群 および SHRSP 群 の PDBu 誘発血管収縮に対する EC_{50} 値は、 $1.98 \pm 0.77 \times 10^{-8}$ M (n=5)、 $8.80 \pm 0.29 \times 10^{-9}$ M (n=5, not significant) であった。この時、高濃度の PDBu はSHRSP 群において持続的な張力の上昇を示した (fig. 8-1, 8-2)。WKY 群 および SHRSP 群 における PDBu 誘発血管収縮作用は、nifedipine (3×10^{-6} M, n=3) の処置または、 Ca^{2+} -free 液に交換することによって完全に消失した。また、PKC に比較的选择性の高い阻害薬である staurosporine (10^{-9} M) 前処置後の SHRSP 群 における PDBu 誘発血管収縮反応を検討したところ収縮反応は部分的に抑制され、WKY 群 の濃度反応曲線とほぼ同様となった。

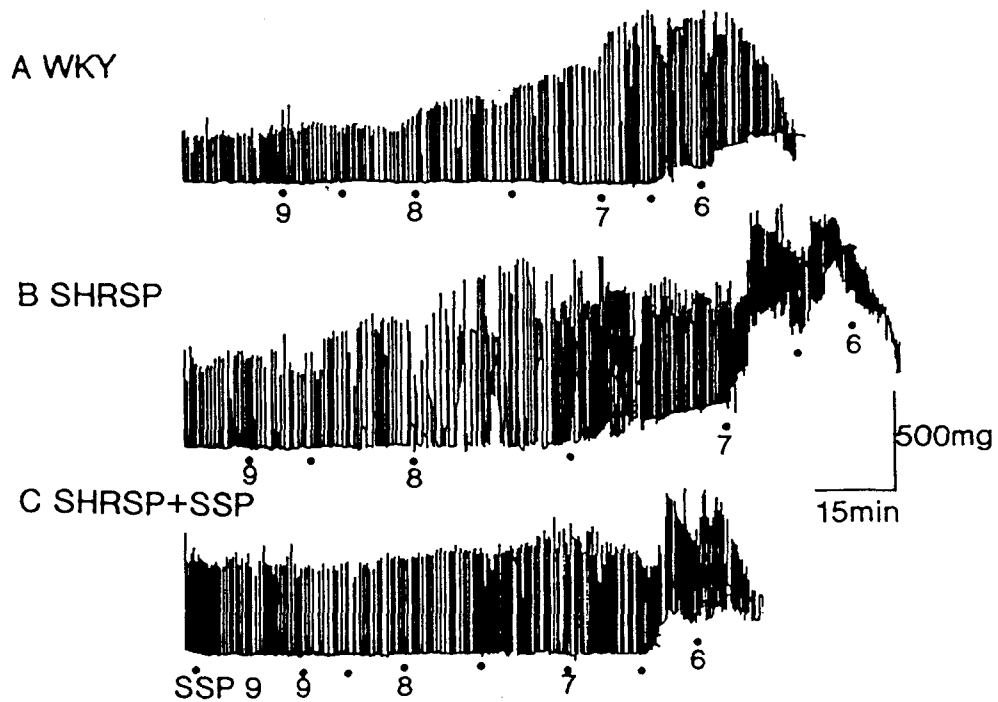


Fig. 8-1 Typical recordings of the effect of phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu) on portal veins from (A) WKY, (B) SHRSP, (C) SHRSP in the presence of 10^{-9} M staurosporine (SSP). Numbers in the figure indicate the $-\log M$ of the drug.

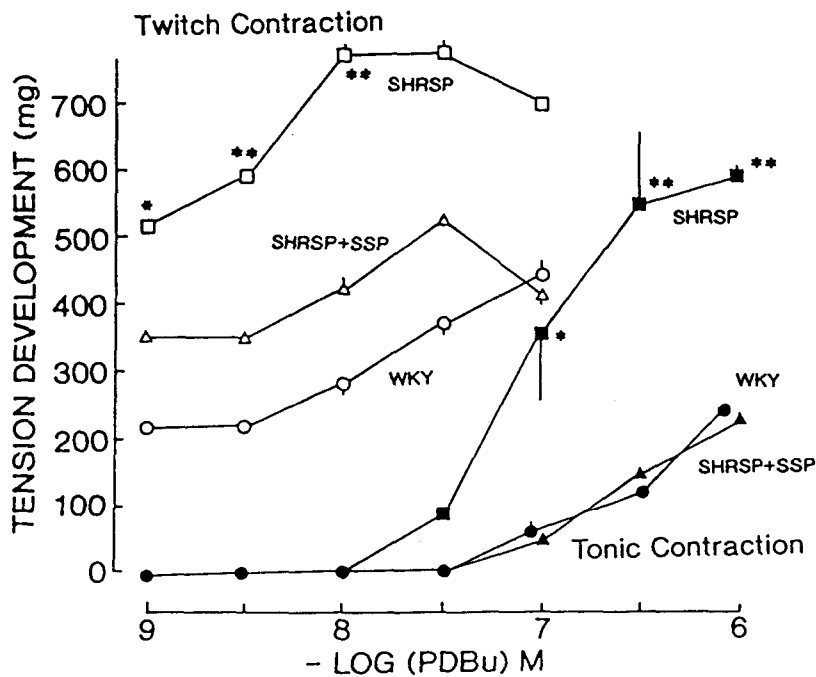


Fig. 8-2 Concentration-response curves for both twitch (open symbol) and tonic (solid symbol) contractile responses to PDBu of portal veins from WKY (circle), SHRSP (square) and SHRSP in the presence of 10^{-9} M staurosporine (SSP, triangle). The values represent the means of the results of 5 experiments, with the mean \pm S.E. indicated by vertical lines. The level of significance was * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

<考察>

本実験の結果から、SHRSP 群の門脈平滑筋は、WKY 群と比較して、PKC 介在性の PDBu 誘発血管収縮反応が有意に増強されていることが明らかとなり、高血圧症時の血管平滑筋では、PKC 活性が高い可能性があることが示唆された。

PDBu 誘発血管収縮作用は、Ca 拮抗薬である nifedipine や、栄養液を Ca^{2+} -free に交換することによって、完全に消失したことから、ラット門脈平滑筋における PDBu 誘発血管収縮は、細胞外液からの Ca イオンの流入に起因するものと考えられた。

SHRSP 群の門脈平滑筋においては、PDBu 誘発血管収縮作用が WKY 群と比較して有意に増強されていたが、staurosporine によって、PKC の活性を抑制した状態では、WKY 群と同様になったことから、SHRSP 群においては、PI 代謝回転が亢進し、PKC 活性が上昇していたと考えられる。この様な、高血圧症ラットの血管平滑筋における phorbol ester 誘発収縮の反応性亢進については、SHR の上腸間膜動脈においても報告されている^{88, 89)}。従って、本実験の結果と考え合わせると高血圧症時には、動脈平滑筋に加えて、門脈平滑筋のような特殊な静脈平滑筋においても PKC の活性が上昇している可能性が示唆され、血管の部位や動静脈等の種類に関わらず、PKC の活性が上昇していると考えられた。高血圧症時には種々血管作動性物質に対して血管反応性が変化することが明らかとなっていることから、この PKC の活性亢進が種々血管作動性物質に対する反応性変化に関与している可能性が示唆された。

第9章 STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化

血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel は、細胞膜において K イオンの透過性を調節していることから間接的に膜電位依存性 Ca²⁺-channel の活性を調節している⁹⁰⁾。そのため近年では、降圧薬としての開発が相次いでいる。中でも、cromakalim は、スミスクラインビーチャム社で開発された薬物で、血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel に選択的に作用して血管を弛緩させることが報告されている⁹¹⁾。糖尿病時には、β-adrenaline 受容体介在性の血管弛緩作用が減弱すること^{52, 92)}や内皮細胞依存性血管弛緩作用が減弱すること^{67, 78, 80, 93)}をすでに見いだした。そこで、糖尿病時の血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化を検討する目的で、cromakalim による血管弛緩反応を検討した。

<実験方法>

1) 使用動物および実験的糖尿病動物の作製法

実験には、雄性 Wistar ラット 8 週齢、体重 200-220 g を用いた。糖尿病群には、pH 4.5 のクエン酸緩衝液に溶解した 60 mg/kg STZ を尾静脈より投与し、実験的糖尿病を誘発した。また、対照群には、溶媒のクエン酸緩衝液のみを静脈内投与した。その後、飲料水および餌は、自由に摂取させ、STZ または溶媒投与の 8-10 週後に実験に用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solution を用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

STZ または溶媒投与の 8-10 週間後に、ラットの頭部を殴打し、総頸動脈からの脱血により致死させた。この際、血液は、血糖値測定用に採取した。大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 3 mm、長さ 20 mm の螺旋状標本作製した。尚、EDRF の影響を除くため内皮細胞は、すべて綿棒にて剝離した状態で実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-611T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は 20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を 10^{-7} M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に 10^{-5} M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10^{-5} M) により弛緩反応が認められないことをもって機能的な内皮細胞の除去を確認した。薬物を洗浄した40分後に、 3×10^{-8} - 10^{-7} M の濃度の NE で血管を収縮させ、反応が安定した後に、cromakalim (10^{-8} - 10^{-5} M) または nicorandil (10^{-8} - 10^{-5} M) を累積的に投与して血管弛緩反応を検討した。尚、nicorandil 誘発弛緩反応に対する oxyhemoglobin (10^{-5} M) の影響を検討する際には、oxyhemoglobin を 15 分間前処置した後、NE で標本を収縮させた。

6) 使用薬物

streptozotocin (Sigma)

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

hemoglobin (Sigma)

acetylcholine chloride (第一製薬)

cromakalim および nicorandil は、大正製薬総合研究所で合成した。

oxyhemoglobin の調製は、Martin⁴⁷⁾ らの方法に従って行なった。

7) データの解析

血管弛緩反応は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。各データは、mean \pm S.E. で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) 対照群および糖尿病群における血糖値

クエン酸緩衝液を投与した対照群の 8-10 週間後の血糖値は、 142.5 ± 6.0 mg/dl (n=20) であった。一方、STZ 投与群における 8-10 週後の血糖値は、 589.8 ± 23.8 mg/dl (n=20, $P < 0.01$) であり、糖尿病群において有意な血糖値の上昇が認められた。尚、STZ 投与群において、血糖値が 300 mg/dl 以下のものは、実験には用いなかった。

2) Cromakalim および nicorandil 誘発血管弛緩反応

Cromakalim は、対照群および糖尿病群のいずれの群においても、NE で収縮させた胸部大動脈を濃度依存的に弛緩させたが、糖尿病群における cromakalim 誘発血管弛緩反応は、対照群と比較して有意に減弱していた (fig. 9-1)。Nicorandil は、対照群および糖尿病群いずれの血管においても濃度依存的な血管弛緩反応を示したが、両群の間には有意な差は認められなかった (fig. 9-2)。この nicorandil による血管弛緩反応は、oxyhemoglobin (10^{-5} M) 前処置により拮抗されたが、oxyhemoglobin 前処置後の nicorandil による血管弛緩反応は、糖尿病群において感受性の低下が認められた (fig. 9-2)。

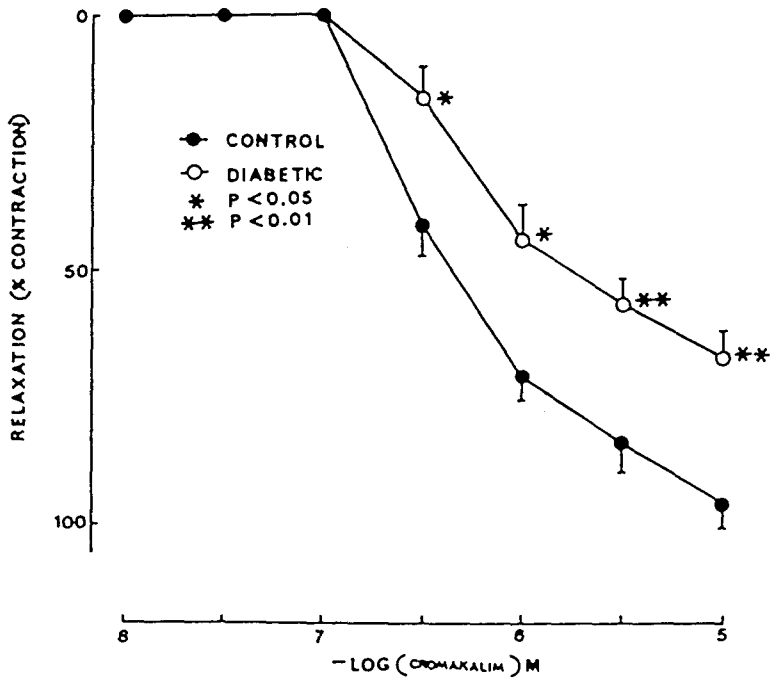


Fig. 9-1 Concentration-response curves for the relaxation responses to cromakalim of aortic strips without endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. The aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M norepinephrine. The values represent the means of results of 6 experiments, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * P < 0.05, ** P < 0.01.

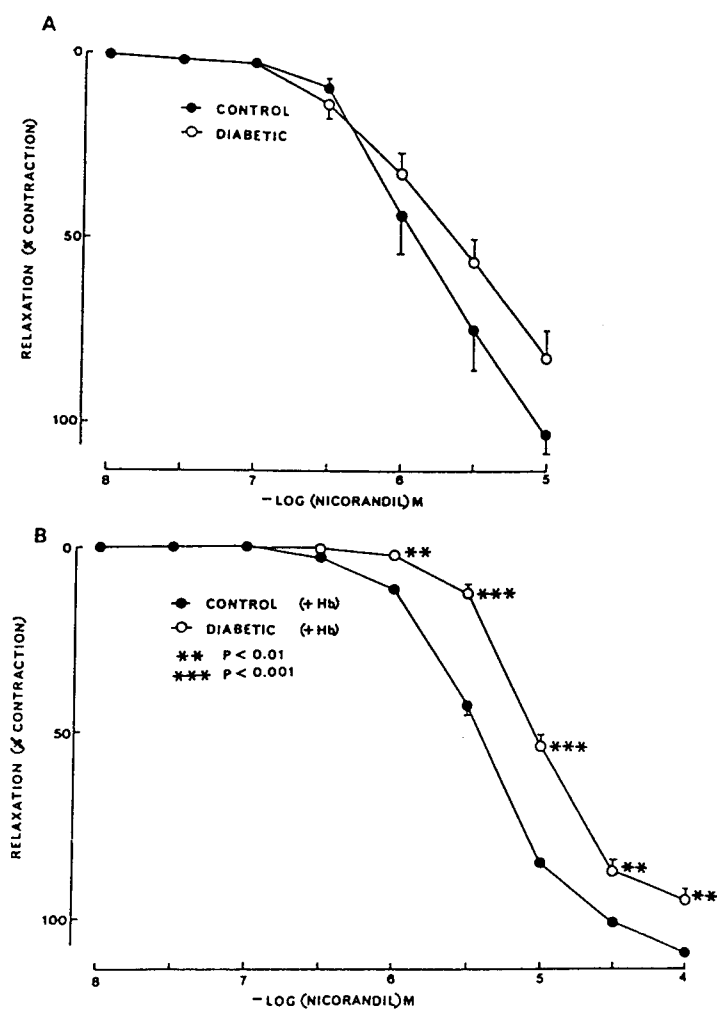


Fig. 9-2 (A) Concentration response curves for the relaxation responses to nicorandil of aortic strips without endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) rats. The aortic strips were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M norepinephrine. (B) The effects of treatment with oxyhemoglobin (Hb) of aortic strips without endothelium from age-matched control (●) and diabetic (○) rats on the concentration-response curves for nicorandil-induced relaxation. The aortic strips were exposed to 10^{-5} M oxyhemoglobin (Hb) for 15 min and were precontracted with 3×10^{-8} - 10^{-7} M norepinephrine, and nicorandil was then added to the bath cumulatively. The values represent the means of results of 6 experiments, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

<考察>

STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における cromakalim による血管弛緩反応が対照群と比較して著明に減弱していたことから、糖尿病ラットの血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能が低下していることが示唆された。

血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel は、細胞膜において K イオンの透過性を変化させ、膜電位を調節していることから、二次的に、Ca²⁺-channel の活性を調節していることが知られている⁹⁰⁾。Cromakalim は血管平滑筋において、この ATP-sensitive K⁺-channel を開口させ、細胞膜の過分極を引き起こして血管を弛緩させることが知られている。本実験において、cromakalim による血管弛緩反応は、糖尿病群において著明に減弱していたことから、糖尿病時には、血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能が低下している可能性が示唆された。そこで、この結果を確認するために、nicorandil を用いてさらに検討を行なった。Nicorandil は、cromakalim と同様に ATP-sensitive K⁺-channel を開口させて血管を弛緩させることが報告されている⁹³⁾。さらに、nicorandil はその構造式中にニトロ基を有しているため、guanylate cyclase を活性化することにより、cyclic GMP を増加させることが明らかとなっている^{94, 95)}。本実験の結果では、nicorandil による血管弛緩反応は、対照群および糖尿病群の間に有意な差は認められなかった。しかし、nitric oxide 結合タンパク質である oxyhemoglobin の存在下では、nicorandil による血管弛緩反応は、対照群と比較すると、糖尿病群で減弱していた。これは、oxyhemoglobin によって、nicorandil の血管弛緩反応における cyclic GMP に起因する部分を遮断されたため、K⁺-channel 開口作用が前面にでた結果であると考えられる。従って、cromakalim で得られた結果と同様に、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては、ATP-sensitive K⁺-channel の機能が低下していることが示唆された。本実験の報告は、糖尿病時の血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化に関する最初の報告であり、後にこの報告を支持する報告がしばしば見られる。

第10章 SHRSP の頸動脈における ATP-sensitive K⁺-channelの機能変化

第9章での検討から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能低下が示唆された⁹⁶⁾。血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channelは、細胞膜において K イオンの透過性を変化させ、膜電位を調節していることから、高血圧症時においてもその機能が変化していることが予想される。そこで、第7章の結果から、内皮細胞依存性血管弛緩反応の減弱が認められている⁹⁷⁾ SHRSP の頸動脈を用いて ATP-sensitive K⁺-channel の開口薬である cromakalim 誘発血管弛緩反応を対照群と比較検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性 SHRSP ラット22-24 週齢および対照群として同週齢の Wistar-Kyoto ラットを用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) 非観血的血圧の測定

ラットの血圧は、実験に供する1日前に非観血的無麻酔下血圧測定装置 (KN-210-1, Natsume) によって測定した。血圧はばらつきを考慮し、3回測定して平均値を求めた。

4) ラット頸動脈リング状標本の作製

ラットの頭部を殴打し、右総頸動脈からの脱血により致死させた。左総頸動脈 (外径約 1 mm、長さ約 10 mm) を摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 2.5 mm のリング状標本を作製した。このリング状標本を、標本固定用のステンレス線 (外径 0.2 mm) に装着した。ステンレス線の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂, 5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には、1.0 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は 20 分毎に交換した。

5) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を 10^{-7} M の norepinephrine で収縮させ、反応が安定した後に、cromakalim (10^{-8} - 10^{-5} M) を投与し血管弛緩反応を検討した。Cromakalim 誘発血管弛緩反応に及ぼす glibenclamide (ATP-sensitive K^{+} -channel blocker) の影響を検討する際には、glibenclamide (10^{-7} M) を 15 分間前処置した後に、norepinephrine で収縮させて検討した。また、静止状態の頸動脈に glibenclamide を投与する際には、 10^{-4} - 3×10^{-4} M を累積投与した。

6) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

glibenclamide (Sigma)

cromakalim は、大正製薬総合研究所で合成した。

7) データの解析

血管弛緩反応は、NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、血管弛緩率 (%) として示した。各データは mean \pm S.E. で表し、有意差検定には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) WKY 群および SHRSP 群における血圧

WKY 群および SHRSP 群における収縮期血圧は、 126.1 ± 2.4 mm Hg (n=15) および 252.4 ± 5.6 mm Hg (n=15, $P < 0.01$) と SHRSP 群において著明な血圧の上昇が認められた。

2) Cromakalim 誘発血管拡張作用および glibenclamide の影響

Cromakalim は、WKY 群および SHRSP 群のいずれの群においても、NE で収縮させた頸動脈を濃度依存的に弛緩させたが、SHRSP 群における cromakalim 誘発血管弛緩反応は、WKY 群と比較して有意に亢進していた (fig. 10-1)。また、SHRSP 群の頸動脈に ATP-sensitive K^+ -channel の遮断薬である glibenclamide (10^{-7} M) を、前処置した後の cromakalim の濃度反応曲線は、右方にシフトし、WKY 群の濃度反応曲線とほぼ同様となった。さらに、SHRSP 群の 8 例中 4 例においては、高濃度の glibenclamide による収縮反応が認められたが、WKY 群においては、8 例中 1 例も収縮反応は示さなかった (fig. 10-1)。

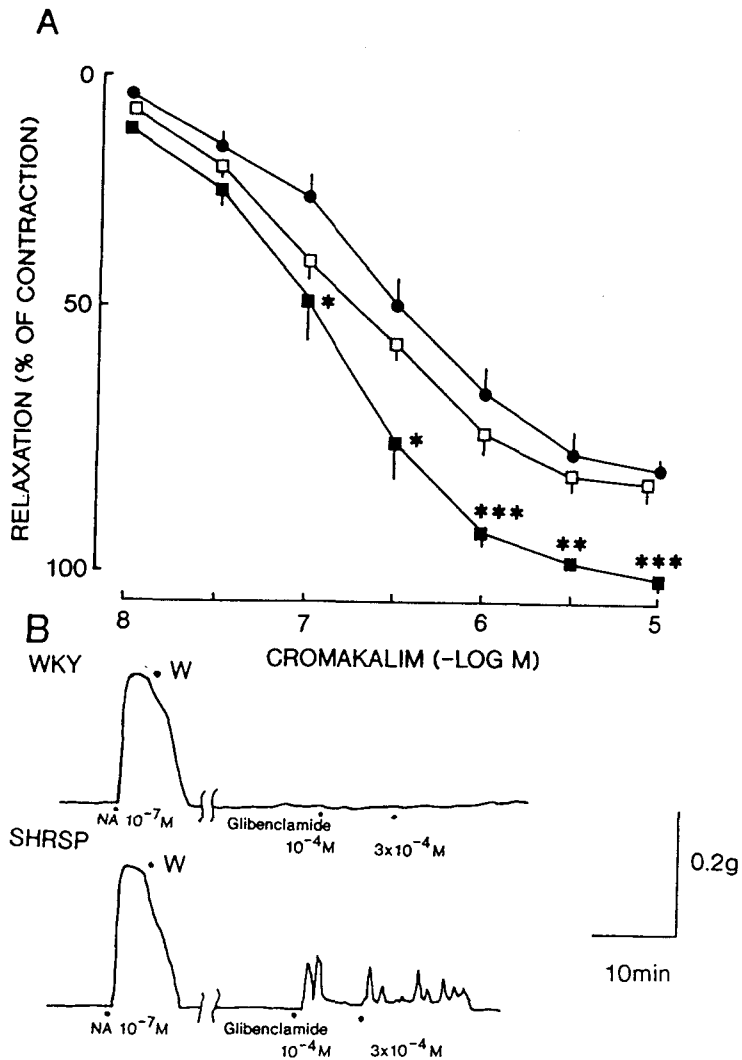


Fig. 10-1 (A) Concentration-response curves for the relaxation responses to cromakalim of carotid arteries from WKY (●) and SHRSP in the absence of (■), and in the presence of (□) $10^{-7}M$ glibenclamide. The carotid arteries were precontracted with $10^{-7}M$ norepinephrine (NE). The carotid arteries were exposed to $10^{-7}M$ glibenclamide for 15 min and were precontracted with NE. The values represent the means of results of 6 experiments, with the means \pm S.E. indicated by vertical lines. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (B) Typical recordings of the effects of glibenclamide (10^{-4} - $3 \times 10^{-4}M$) on carotid arteries from WKY and SHRSP. NA: norepinephrine.

<考察>

本実験において、SHRSP の頸動脈における cromakalim による血管弛緩反応が対照群と比較して著明に亢進していたことから、高血圧症ラットの血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能が亢進していることが示唆された。

SHRSP 群の頸動脈においては、cromakalim 誘発血管弛緩反応が WKY 群と比較して有意に増強されていたが、ATP-sensitive K⁺-channel 遮断薬である⁹⁸⁾ glibenclamide (10⁻⁷ M) によって、ATP-sensitive K⁺-channel の活性を抑制した状態では、WKY 群と同様になったことから、SHRSP 群においては、ATP-sensitive K⁺-channel の機能が亢進していることが示唆された。さらに、高濃度の glibenclamide により、SHRSP 群の一部で収縮作用が認められた。このような結果は、今までに報告がないが、静止状態における SHRSP 群の頸動脈では、ATP-sensitive K⁺-channel の活性が異常に亢進し、その結果、glibenclamide により収縮反応が惹起されたと考えられた。これに関して、血管平滑筋において、高濃度の glibenclamide が、遅延性外向き電流を抑制するという報告もあり⁹⁹⁾、一部この収縮反応にも関与している可能性が考えられた。第9章での実験から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては、ATP-sensitive K⁺-channel の機能が低下していることが認められており、今回得られた結果は、全く逆の結果であった。それぞれの病態において、どのような原因で ATP-sensitive K⁺-channel の機能が変化し、また、逆の結果となるのかは現在までの所全く不明でありさらなる検討が必要である。本実験の報告は、高血圧症時の血管平滑筋における ATP-sensitive K⁺-channel の機能変化に関する最初の報告である。

第11章 Cyclic GMP 増加薬の α -adrenaline 受容体介在性血管収縮抑制作用

Cyclic GMP は種々平滑筋において弛緩作用を示すことが報告されている。Cyclic GMP の血管平滑筋弛緩機序に関しては、細胞内 Ca イオンの細胞外へのくみ出し、細胞内 Ca 貯蔵部位への Ca^{2+} の取り込み促進、 Ca^{2+} 流入抑制等が関与していると報告されているが¹⁷⁾、種や血管部位によって異なるといわれている。Cyclic GMP を増加させる薬物としては、nitroglycerin (抗狭心症薬) に代表されるようなニトロ化合物が知られている。Nitroglycerin は soluble guanylate cyclase を活性化して、細胞内 cyclic GMP を増加させる作用を有し^{15,16)}、特に、心臓の太い冠血管を拡張させて虚血部位への血流を増やすこと、また、静脈系を拡張させて心臓への前負荷を軽減することにより、抗狭心症作用を有すると考えられている¹⁰⁰⁾。また、その他の cyclic GMP 増加薬としては、atrial natriuretic peptide (ANP, 心房性ナトリウム利尿ペプチド) が挙げられる。この ANP は、particulate guanylate cyclase を活性化することが知られている⁶³⁾。CD-349 (2-nitratopropyl-3-nitratopropyl-2-dimethyl-4,13-nitratophenyl, 1,4 dihydropyridine-3,5-dicarboxylate) は、ジヒドロピリジン系のカルシウム拮抗薬であり¹⁰¹⁾、結合実験から特異的に Ca^{2+} -channel に結合することが示唆されている¹⁰²⁾。CD-349 は血管中 cyclic GMP を増加させることが明らかとなっているが¹⁰³⁾、血管系において実際に cyclic GMP を介する反応を示すかどうかは明らかとなっていない。第1章での検討から、STZ 誘発糖尿病ラットの血管平滑筋においては α -adrenaline 受容体介在性血管収縮作用は著明に亢進していることが明らかとなっている³⁷⁾。また、高血圧症時には交感神経の緊張が異常に高まり、末梢血管抵抗の増大が起こることが知られおり、これが、高血圧症発症に深く関与していると考えられている¹⁰⁴⁾。そこで、交感神経の神経伝達物質である norepinephrine (NE) 誘発血管収縮反応に対する cyclic GMP 増加薬の影響を検討した。特に本章では、CD-349 の cyclic GMP 増加作用に焦点を合わせて詳細な検討を行なった。尚、本章以後では、ラット胸部大動脈と血管平滑筋における収縮機構が類似しているウサギ胸部大動脈を用いて薬物の作用を検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性日本白色ウサギ（体重 2.1-4.5 kg）および雄性 Wistar 系ラット10-20 週齢（体重 230-420 g）を用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ウサギおよびラット胸部大動脈螺旋状標本の作製

ウサギは、pentobarbital (40 mg/kg, i. v.) で麻酔した後、総頸動脈より脱血致死させた。その後大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 2 mm、長さ 15 mm の螺旋状標本作製した。尚、EDRF の影響を除去するため内皮細胞は、すべて綿棒にて剝離した状態で実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には 2 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は 20 分毎に交換した。

ラットを用いる際には、頭部を殴打し、総頸動脈より脱血致死させた。その後、胸部大動脈をすばやく摘出し、幅 2 mm、長さ 15 mm の螺旋状標本作製して、以後ウサギ大動脈と同様の方法で行なった。尚、ラットの際には、静止張力は、1 g で行なった。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を、 10^{-7} M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、 10^{-5} M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10^{-5} M) により弛緩反応が認められないことをもって機能的な内皮細胞の除去を確認した。

4-1) ウサギ胸部大動脈における 64 mM KCl 収縮に対する各薬物の影響

内皮細胞の除去を確認した後、64 mM KCl を 20 分間隔で反復投与し、収縮反応が一定になるまで行なった。収縮反応が一定になった後、nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M), CD-349 (10^{-9} - 10^{-5} M), nifedipine (10^{-9} - 10^{-5} M), および 8-Br-cyclic GMP (10^{-3} M) を、10 倍間隔の濃度で 15 分間前処置し、その後に 64 mM KCl を投与して、収縮抑制作用を検討した。

4-2) ウサギ胸部大動脈における 10^{-6} M NE 収縮に対する各薬物の影響

内皮細胞の除去を確認した後、 10^{-6} M NE を 20 分間隔で反復投与し、収縮反応が一定になるまで行なった。収縮反応が一定になった後、nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M), CD-349 (10^{-9} - 10^{-5} M), nifedipine (10^{-9} - 10^{-5} M) および 8-Br-cyclic GMP (10^{-6} - 10^{-3} M) を、10 倍間隔の濃度で 15 分間前処置し、その後に 10^{-6} M NE を投与して、収縮抑制作用を検討した。

4-3) ウサギ胸部大動脈における CD-349 の NE 収縮抑制作用に対する各種 cyclic GMP modulator の影響

NE (10^{-6} M) 反復投与により、収縮反応が一定となった後、CD-349 の NE 収縮抑制作用に対する各種 cyclic GMP modulator の影響を検討した。Cyclic GMP modulator としては、methylene blue (10^{-5} M), oxyhemoglobin (10^{-5} M) および zaprinast (3×10^{-5} M) を用い、これらの薬物は、CD-349 (10^{-5} M) と同時に organ bath 内に投与することによって検討した。

4-4) ラットまたはウサギ胸部大動脈における CD-349, nifedipine および 8-Br-cyclic GMP の Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮および Ca^{2+} 誘発収縮抑制作用

Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮および Ca^{2+} 収縮作用を検討する際には、1 mM EGTA を含んだ Ca^{2+} -free の栄養液に交換し、15 分後に NE (10^{-6} M) を投与することによって行なった。また、さらに

NE 投与による一過性の収縮が、プラトーレベルに戻った後に、CaCl₂ (0.1-5.0 mM) を累積投与して、Ca²⁺ 収縮を検討した。これらの反応に対する CD-349 (10⁻⁸-10⁻⁵ M), nifedipine (10⁻⁵ M) および 8-Br-cyclic GMP (10⁻⁵-10⁻⁴ M) の影響を検討する際には、これらの薬物は、Ca²⁺-free の栄養液に交換する際に同時に投与し、15 分後に、NE (10⁻⁶ M) を投与した。

4-5) 血管中 cyclic GMP 量の測定

血管中 cyclic GMP の定量は、radioimmunoassay 法にて行なった。ラットまたはウサギより胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。各血管の湿重量を測定した後、血管を 5 ml の栄養液が入った試験管に移し、37 °C に保温して、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気しながら、60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、CD-349 (10⁻⁷-10⁻⁵ M) を添加して 1, 5, 15 分間インキュベーションした。その後に液体窒素にて凍結した。凍結した標本をポリトロンホモジナイザー (Polytron Kinematica) を用いて、6% trichloroacetic acid 1 ml を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3000 g, 4 °C, 10 min) 後、上清を分取した。上清を水飽和 ether で 4 回洗浄して、trichloroacetic acid を除去した。以上のように調製したサンプル中の cyclic GMP を radioimmunoassay 法にて定量した。血管中 cyclic GMP 量は、血管の湿重量当りに補正し表した。

5) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

nifedipine hydrochloride (Sigma)

8-Br-cyclic GMP (Sigma)

methylene blue (Sigma)

hemoglobin (Sigma)

nitroglycerin (日本化薬)

acetylcholine chloride (第一製薬)

cyclic GMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

CD-349 は、大正製薬総合研究所で合成した。

oxyhemoglobin の調製法は、Martin⁴⁷⁾ らの方法に従って調製した。

6) データの解析

収縮抑制作用は、64 mM KCl または 10^{-6} M NE による収縮力を 100 % とした時の割合を、抑制率 (%) として示した。また、50 % 抑制率 (IC_{50}) は、64 mM KCl による収縮を、50 % 抑制する抑制薬の濃度として示した。各データは mean \pm S.E. で表し、有意差検定は Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。また、2群間の比較には、Student の unpaired t-test を用いた。

<実験結果>

1) ウサギ胸部大動脈における 64 mM KCl 収縮に対する各薬物の影響

ウサギ胸部大動脈における 64 mM KCl 誘発収縮反応は、 2.15 ± 0.17 g であった。

CD-349 (10^{-9} - 10^{-5} M) および nifedipine (10^{-9} - 10^{-5} M) は、この KCl 収縮を低濃度から濃度依存的に抑制した (fig. 11-1)。CD-349 および nifedipine の KCl 収縮に対する 50 % 抑制率は、 $7.5 \pm 3.3 \times 10^{-8}$ M (n=5) および $1.6 \pm 1.0 \times 10^{-7}$ M (n=4) であった。しかし、nitroglycerin および 8-Br-cyclic GMP はこの KCl 誘発収縮を全く抑制しなかった (data not shown)。

2) ウサギ胸部大動脈における 10^{-6} M NE 収縮に対する各薬物の影響

ウサギ胸部大動脈における 10^{-6} M NE 誘発収縮反応は、 2.31 ± 0.11 g であった。CD-349 (10^{-8} - 10^{-5} M), nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M) および 8-Br-cyclic GMP (10^{-6} - 10^{-3} M) は、この NE 収縮を濃度依存的に抑制した (fig. 11-2)。しかし、nifedipine はこの NE 誘発収縮を全く抑制しなかった (fig. 11-2)。

3) ウサギ胸部大動脈における CD-349 の NE 収縮抑制作用に対する各種 cyclic GMP modulator の影響

Methylene blue (10^{-5} M, 可溶性グアニレートサイクラーゼ阻害薬) および oxyhemoglobin (10^{-5} M, nitric oxide 結合タンパク質) は、いずれも、CD-349 (10^{-5} M) の NE 収縮抑制作用に対して、拮抗作用を示した (fig. 11-3)。また、zaprinast (3×10^{-5} M, cyclic GMP 選択的 phosphodiesterase 阻害薬) により CD-349 (10^{-5} M) の NE 収縮抑制作用は増強された (fig. 11-3)。

4) ラットまたはウサギ胸部大動脈における CD-349, nifedipine および 8-Br-cyclic GMP の Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮および Ca 誘発収縮抑制作用

CD-349 (10^{-8} - 10^{-5} M) および 8-Br-cyclic GMP (10^{-5} - 10^{-4} M) は、ウサギ大動脈における Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮を濃度依存的に抑制した (fig. 11-4, 5)。CD-349 の Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮抑制作用はラット大動脈においても認められ、この作用は methylene blue (10^{-5} M) の処置によって、

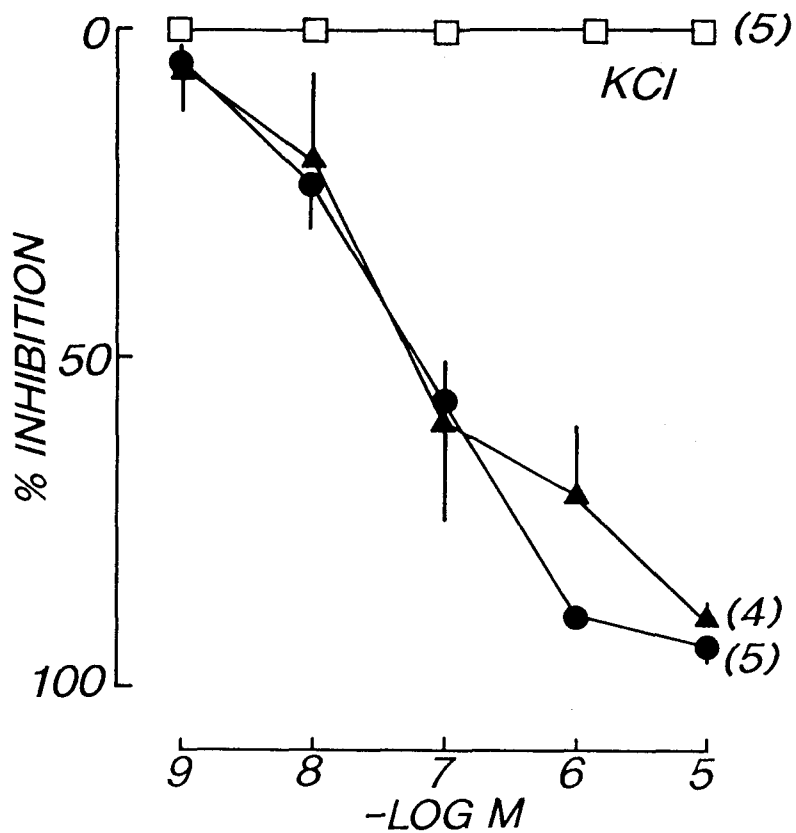


Fig. 11-1 Concentration-response curves for inhibitory effects of CD-349 (●), nifedipine (▲) and nitroglycerin (○) on 64 mM KCl-induced contraction responses in rabbit aorta. All data are reported as the mean \pm S.E.. The inhibitory effect of each drug was expressed as the percentage of inhibition of a steady contraction of each aortic strip induced by 64 mM KCl. Numbers in parentheses are the number of animals.

拮抗された (fig. 11-6)。しかし、nifedipine (10^{-5} M) は、ウサギおよびラットのいずれの大動脈においても、 Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮を抑制しなかった (fig. 11-4,6)。さらに、CD-349 (10^{-8} - 10^{-5} M) および 8-Br-cyclic GMP (10^{-5} - 10^{-4} M) は、ウサギ大動脈において Ca^{2+} -free 液下 NE 収縮に続く Ca^{2+} 収縮作用を濃度依存的に抑制した (fig. 11-7)。しかし、nifedipine (10^{-5} M) は、ウサギ大動脈における Ca^{2+} 収縮を抑制しなかった。(fig. 11-8)。

5) CD-349 による血管中 cyclic GMP 量の測定

ウサギ胸部大動脈における血管中 cyclic GMP の basal level は、 32.1 ± 6.3 fmol / mg tissue (n=5) であった。CD-349 (10^{-7} - 10^{-5} M) は、ウサギ胸部大動脈において、この血管中 cyclic GMP 量を濃度依存的に増加させた (table 11-1)。その増加の程度は、 10^{-7} M で 1.3 倍、 10^{-6} M で 2.8 倍、 10^{-5} M で 4.4 倍であった。また、CD-349 は、ラット胸部大動脈においても、血管中 cyclic GMP を濃度依存的に増加させ、その cyclic GMP の増加は、methylene blue の前処置により抑制された (table 11-1)。

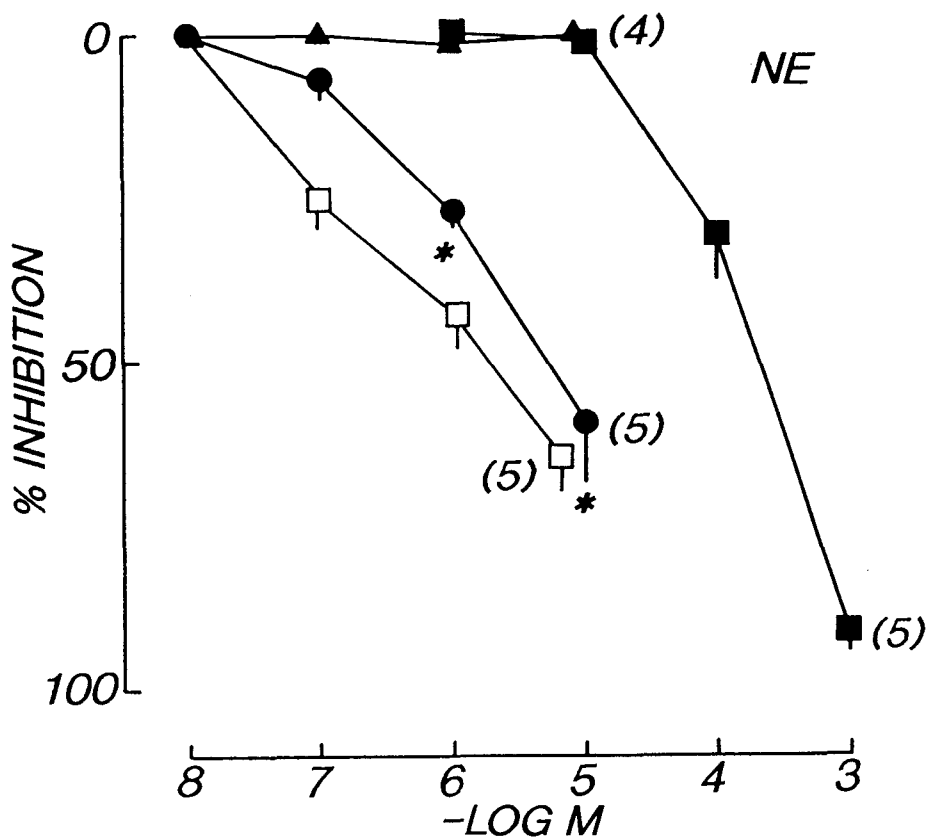


Fig. 11-2 Concentration-response curves for inhibitory effects of CD-349 (●), nifedipine (▲), nitroglycerin (□) and 8-Br-cyclic GMP (■) on 10⁻⁶ M norepinephrine (NE)-induced contraction responses in rabbit aorta. All data are expressed as the mean ± S.E. The inhibitory effect of each drug was expressed as the percentage of inhibition of a steady contraction of each aortic strip induced by NE. Numbers in parentheses are the number of animals.

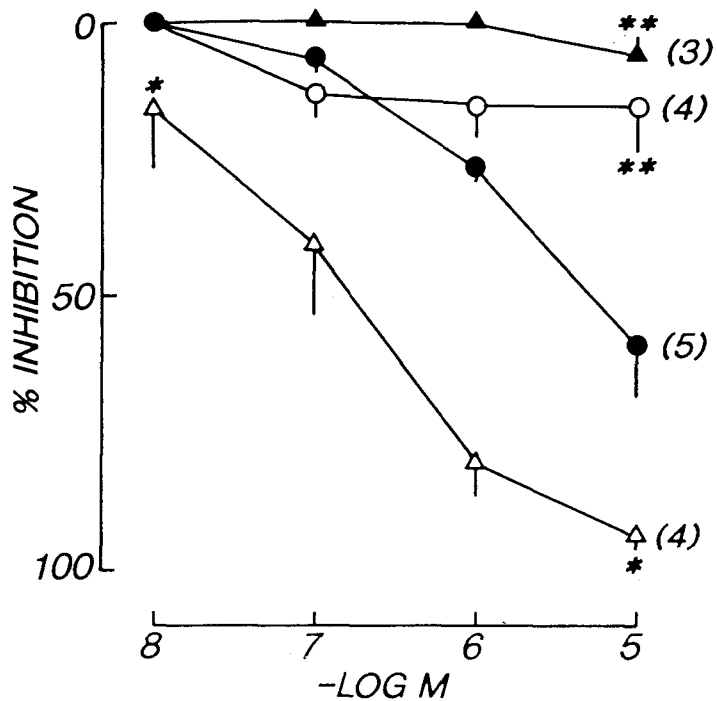


Fig. 11-3 Effects of methylene blue (O, 10^{-5} M), oxyhemoglobin (▲, 10^{-5} M) and zaprinast (△, 3×10^{-5} M) on the inhibitory effects of CD-349 (●) in norepinephrine (NE)-induced contraction response of rabbit aorta. The inhibitory effect of each drug was expressed as the percentage of inhibition of a steady contraction of each aortic strip induced by 10^{-6} M NE. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$ vs. CD-349 (10^{-5} M).

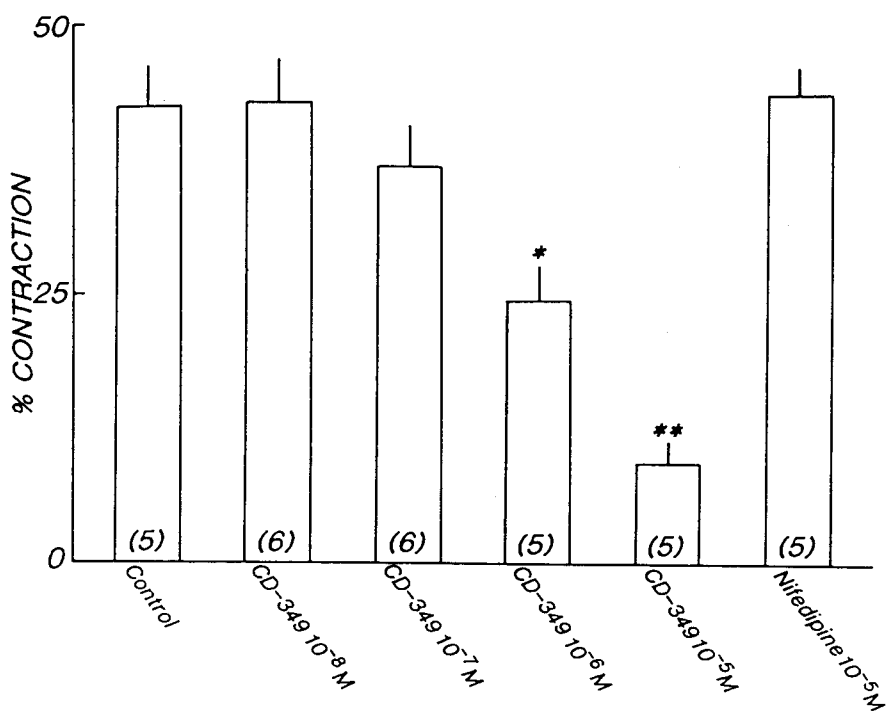


Fig. 11-4 Inhibitory effects of CD-349 and nifedipine on 10^{-6} M norepinephrine (NE)-induced contraction of rabbit aorta in Ca^{2+} -free solution. To examine the effects of these agents, the aortic strips were exposed to the agents for 15 min in Ca^{2+} -free solution, and then 10^{-6} M NE was added to the bath. The inhibitory effects of these agents are expressed as the percentage of a steady contraction of each strip induced by 10^{-6} M NE in normal solution. Number of parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. vs. control.

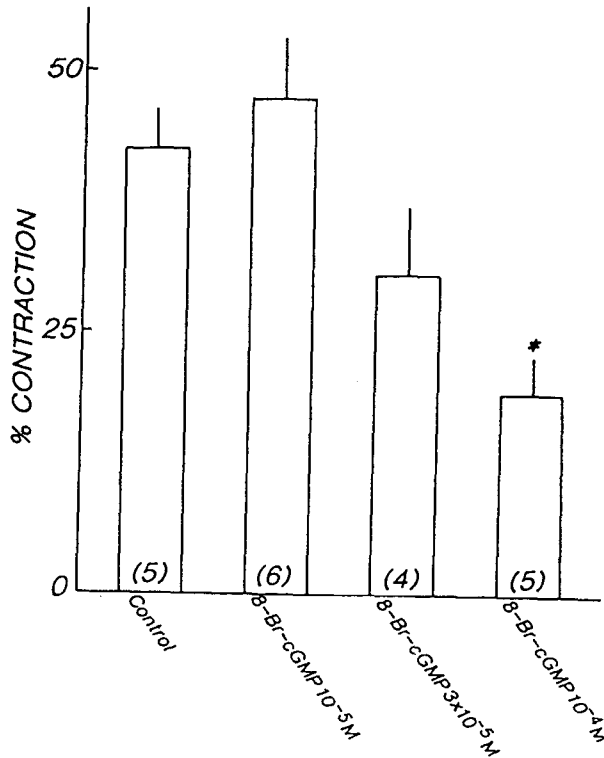


Fig. 11-5 Inhibitory effects of 8-Br-cyclic GMP on 10^{-6} M norepinephrine (NE)-induced contraction of rabbit aorta in Ca^{2+} -free solution. To examine the effects of the agent, the aortic strips were exposed to the agent for 15 min in Ca^{2+} -free solution, and then 10^{-6} M NE was added to the bath. The inhibitory effects of these agents are expressed as the percentage of a steady contraction of each strip induced by 10^{-6} M NE in normal solution. Number of parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, vs. control.

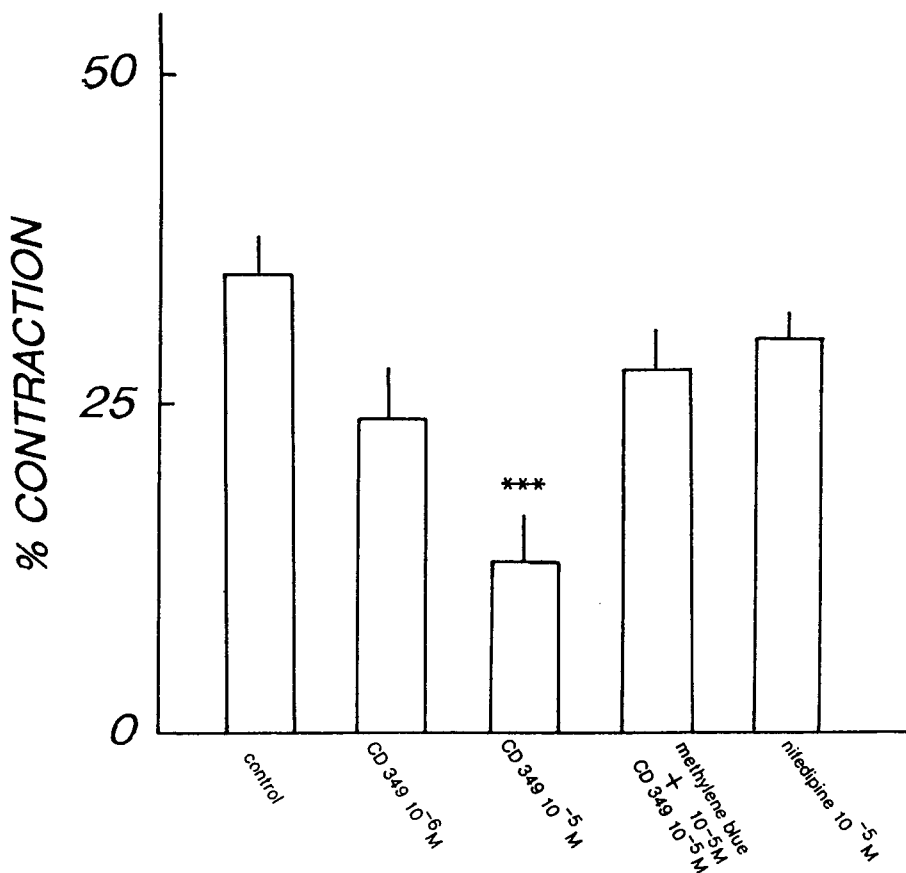


Fig. 11-6 Inhibitory effects of CD-349 and nifedipine on 10^{-6} M norepinephrine (NE)-induced contraction of rat aorta in Ca^{2+} -free solution. To examine the effects of these agents, the aortic strips were exposed to the agents for 15 min in Ca^{2+} -free solution, and then 10^{-6} M NE was added to the bath. The inhibitory effects of these agents are expressed as the percentage of a steady contraction of each strip induced by 10^{-6} M NE in normal solution. Number of parentheses are the number of animals. *** $P < 0.001$ vs. control.

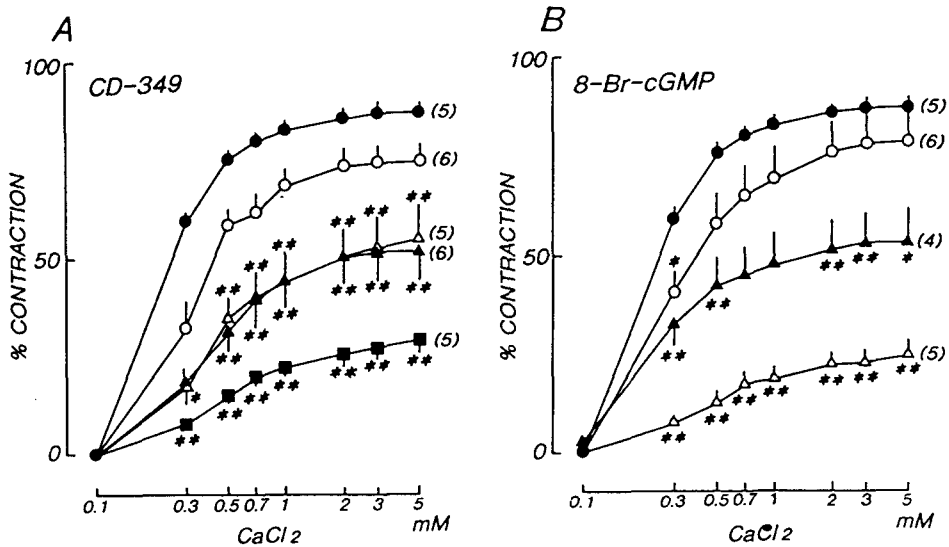


Fig. 11-7 (A) Concentration-response curves for inhibitory effects of CD-349 (○, 10^{-8} M), (▲, 10^{-7} M), (△, 10^{-6} M), (■, 10^{-5} M) on Ca^{2+} -induced contraction (●) of the rabbit aortic strips preincubated with 10^{-6} M norepinephrine (NE) in Ca^{2+} -free solution. (B) Concentration-response curves for inhibitory effects of 8-Br-cyclic GMP (○, 10^{-5} M), (▲, 3×10^{-5} M), (△, 10^{-4} M) on Ca^{2+} -induced contraction (●) of the rabbit aortic strips preincubated with 10^{-6} M (NE) in Ca^{2+} -free solution. The inhibitory effects of CD-349 and 8-Br-cyclic GMP are expressed as the percentage of a steady contraction of each aortic strips induced by 10^{-6} M NE in normal solution. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

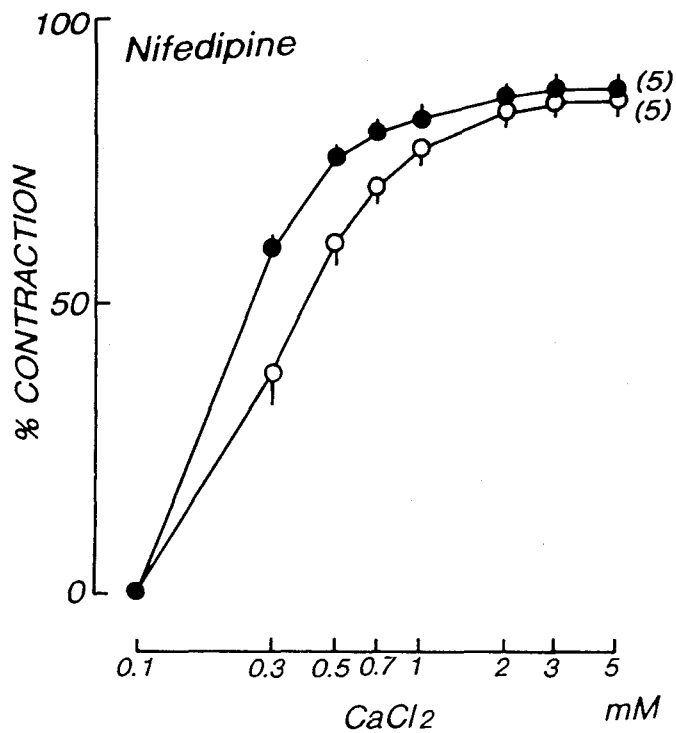


Fig. 11-8 Concentration-response curves for inhibitory effects of nifedipine (○, 10^{-5} M) on Ca^{2+} -induced contraction (●) of the rabbit aortic strips preincubated with 10^{-6} M (NE) in Ca^{2+} -free solution. The inhibitory effects of nifedipine are expressed as the percentage of a steady contraction of each aortic strips induced by 10^{-6} M NE in normal solution. Numbers in parentheses are the number of animals.

Table 11-1 CD-349-induced production of cyclic GMP in rat and rabbit aorta without endothelium

Agent	Rat aorta cyclic GMP (fmol/ mg tissue)	Rabbit aorta cyclic GMP (fmol/ mg tissue)
None	53.2 ± 12.8 (n=5)	32.1 ± 6.3 (n=5)
CD-349 (10 ⁻⁷ M)	not tested	42.6 ± 2.5 (n=5)
(10 ⁻⁶ M)	66.2 ± 22.5 (n=5)	90.7 ± 7.5 (n=5)
(10 ⁻⁵ M)	110.5 ± 11.1* (n=5)	142.4 ± 20.8* (n=5)
CD-349 (10 ⁻⁵ M) + methylene blue (10 ⁻⁵ M)	48.0 ± 8.3 (n=5)	not tested

Values are mean ± S.E. * P < 0.05 is significantly different from control (none).
n, number of animals. Aortic strips were exposed to CD-349 for 15 min.

<考察>

本実験の結果から、cyclic GMP 増加薬は、ウサギおよびラット胸部大動脈において、NE 誘発血管収縮を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。この NE 収縮抑制作用は、Ca 拮抗薬である nifedipine といった代表的な血管拡張薬には認められない作用であった。また、cyclic GMP 増加薬の NE 収縮抑制作用には、phosphatidylinositol 代謝回転を介した細胞内 Ca^{2+} による収縮抑制および受容体制御 Ca^{2+} -channel からの Ca^{2+} 流入の阻害などが考えられた。

ウサギ胸部大動脈における KCl 誘発血管収縮は、Ca 拮抗性を有する nifedipine および CD-349 により抑制されたが cyclic GMP 増加薬である nitroglycerin および cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP では、全く抑制されなかった。このことから、ウサギ胸部大動脈においては、cyclic GMP 増加薬は、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel に対する抑制作用はないことが明らかとなった。一方、ウサギ胸部大動脈における NE 誘発血管収縮は、KCl 収縮の結果とは異なり、Ca 拮抗薬である nifedipine では抑制されず、nitroglycerin, CD-349 および 8-Br-cyclic GMP で抑制されたことから、NE のような受容体制御 Ca^{2+} -channel からの Ca^{2+} 流入を介した収縮には、Ca 拮抗作用は無効で、cyclic GMP 増加薬が効果的に抑制することが明らかとなった。

CD-349 は以前までの検討から、血管中 cyclic GMP は増加させるが¹⁰³⁾、摘出血管でメカニカルな反応に反映されるかどうかは明らかではなかった。しかし、本実験の結果から、CD-349 は、nifedipine のような Ca 拮抗性に加えて、cyclic GMP 増加薬様の作用も有していることが明らかとなった。そこで、CD-349 の cyclic GMP 増加薬様作用に注目してさらに検討を行なった。

CD-349 の NE 誘発収縮抑制作用は、methylene blue (soluble guanylate cyclase 阻害薬⁴⁷⁾) および oxyhemoglobin (NO 結合タンパク質⁴⁷⁾) により抑制されたことから、CD-349 の作用は、その構造式の中から、NO を放出し、その NO が、guanylate cyclase を活性化して、血管中 cyclic GMP を増加させている可能性が示唆された。さらに、zaprinast (cyclic GMP 選択的 phosphodiesterase 阻害薬¹⁰⁵⁾) によって、CD-349 の作用は増強されたことから、CD-349 の cyclic GMP 増加作用が発現されていることが示唆された。実際に血管中 cyclic GMP 量を測定した結果、CD-349 は、ウサギおよびラットの大動脈において、濃度依存的な増加作用を示すことが確認された。

NE 誘発血管収縮の初期相には、phosphatidylinositol (PI) 代謝回転を介して産生された

inositol trisphosphate (IP₃) による細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca²⁺ 放出が関係していると考えられている³⁶⁾。本実験の結果から、CD-349 は、ウサギおよびラット大動脈における Ca²⁺-free 液下 NE 収縮を濃度依存的に抑制した。さらに、8-Br-cyclic GMP も同様に Ca²⁺-free 液下 NE 収縮を濃度依存的に抑制したことから、cyclic GMP は、この収縮経路のいずれかを抑制している可能性が考えられる。現在までのところ、詳細に関しては不明であるが、Rapoport らの報告¹⁰⁶⁾によれば、ニトロ化合物は NE 誘発収縮を抑制し、その抑制は、cyclic GMP による PI の加水分解過程の抑制が関与しているという。従って、本実験においても同様の可能性が考えられた。また、CD-349 は、8-Br-cyclic GMP と同様にウサギ大動脈において Ca²⁺-free 液下 NE 収縮に続く Ca²⁺ 収縮作用を濃度依存的に抑制したことから、cyclic GMP は、受容体制御 Ca²⁺-channel からの Ca²⁺ の流入も抑制する可能性が示唆された。

以上のように CD-349 および cyclic GMP analog の 8-Br-cyclic GMP は NE 誘発収縮を抑制することが明らかとなった。第 1 章での検討から、STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては、NE 誘発血管収縮反応が有意に増強していることを明らかにした。さらに、高血圧自然発症ラットにおいては、交感神経の緊張度が異常に亢進することによって血管収縮が起こり、このことが末梢血管抵抗の増大に関与していることが明らかとなっている¹⁰⁴⁾。また、これらのことは、高血圧症治療薬として、prazosin や doxazosin 等の α -adrenaline 受容体遮断剤が有用であるということからも裏付けられている。本実験の結果から、cyclic GMP 増加薬が Ca 拮抗薬には認められない作用として NE 収縮抑制効果を有していることが明らかとなり、糖尿病時および高血圧症時における交感神経性血管収縮に有用となる可能性が示唆された。

第12章 β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応の cyclic GMP 増加薬による増強作用と血管中 cyclic nucleotide 量の変化

第2章および第3章での検討から、STZ 誘発糖尿病ラットおよび自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈においては β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応は、著明に減弱していることが明らかとなっている^{52,92)}。また、高血圧症動物においても β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応は、著明に減弱していることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。血管平滑筋における β -adrenaline 受容体は血管拡張性に働いていることから、その機能が低下すると血管抵抗の増大が起こることが考えられる。また、 β -adrenaline 受容体作動薬が血管平滑筋の受容体に作用すると、adenylate cyclase が活性化され、血管中 cyclic AMP が上昇し、血管弛緩反応を発現すると考えられている。Cyclic GMP と cyclic AMP の相互作用に関してはカエル心室筋において、cyclic GMP が isoproterenol (ISO) による cyclic AMP 介在性の Ca^{2+} 電流を抑制することが報告されている¹⁰⁷⁾。しかし、血管平滑筋においては cyclic GMP と cyclic AMP の相互作用に関する報告はない。そこで本章では cyclic GMP 増加薬と β -adrenaline 受容体作動薬の血管平滑筋における相互作用について検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性日本白色ウサギ（体重 2.1-4.5 kg）を用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄, 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は調製後、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを常時通気し、37 °C に加温した。

3) ウサギ胸部大動脈螺旋状標本の作製

ウサギは pentobarbital (40 mg/kg, i. v.) で麻酔した後、総頸動脈より脱血致死させた。その後大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 2 mm、長さ 15 mm の螺旋状標本を作製した。尚、内皮細胞由来弛緩因子の影響を除去するため内皮細胞は、すべて綿棒にて剝離した状態で実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °C に保温した。標本には 2 g の静止張力を負荷して、60-90 分間プレインキュベーションした後、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のプレインキュベーションの後、血管を 10⁻⁷ M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、10⁻⁵ M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10⁻⁵ M) により弛緩反応が認められないことをもって機能的な内皮細胞の除去を確認した。その 40 分後に endo-

thelin-1 (ET-1, 10^{-7} M) で血管を収縮させ、反応が安定した後に、ISO (10^{-8} - 10^{-5} M) または forskolin (FSK, 10^{-8} - 10^{-5} M) を累積的に投与して血管弛緩反応を検討した。尚、ISO または FSK 誘発弛緩反応に対する nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M)、atrial natriuretic peptide (ANP, 10^{-10} - 10^{-8} M)、CD-349 (10^{-9} - 10^{-5} M)、8-Br-cyclic GMP (3×10^{-6} - 3×10^{-4} M)、nifedipine (10^{-5} M) および nicardipine (10^{-5} M) の影響を検討する際には、これらの薬物を 15 分間前処置した後、ET-1 で標本を収縮させた。なお、methylene blue (10^{-5} M) および oxyhemoglobin (10^{-5} M) の影響を検討する際には、nitroglycerin または CD-349 などの各種薬物と同時に organ bath 内に投与することによって検討した。

5) 血管中 cyclic nucleotide 量の測定

血管中 cyclic GMP および cyclic AMP の定量は、radioimmunoassay 法にて行なった。ウサギより胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O_2 -5 % CO_2 の混合ガスを通気した栄養液に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。各血管の湿重量を測定した後、血管を 5 ml の栄養液が入った試験管に移し、37 °C に保温して、95 % O_2 -5 % CO_2 の混合ガスを通気しながら、60 分間インキュベートした。インキュベーションの後、ISO (10^{-5} M)、8-Br-cyclic GMP または CD-349 (10^{-7} - 10^{-5} M) を添加して 15 分間インキュベーションした。その後に液体窒素にて凍結した。凍結した標本をポリトロンホモジナイザー (Polytron Kinematica) を用いて、6% trichloroacetic acid 1 ml を加えてホモジナイズし、遠心分離 (3000 g, 4 °C, 10 min) 後、上清を分取した。上清を水飽和 ether で 4 回洗浄して、trichloroacetic acid を除去した。以上のように調製したサンプル中の cyclic GMP および cyclic AMP を radioimmunoassay 法にて定量した。血管中 cyclic GMP および cyclic AMP 量は、血管の湿重量当りに補正し表した。

6) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

nifedipine hydrochloride (Sigma)

nicardipine hydrochloride (Sigma)

8-Br-cyclic GMP (Sigma)

methylene blue (Sigma)

hemoglobin (Sigma)

nitroglycerin (日本化薬)

acetylcholine chloride (第一製薬)

atrial natriuretic peptide (ペプチド研究所)

endothelin-1 (ペプチド研究所)

cyclic GMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

cyclic AMP radioimmunoassay kit (ヤマサ醤油)

CD-349 は、大正製薬総合研究所で合成した。

oxyhemoglobin は、Martin らの方法⁴⁷⁾に従って調製した。

7) データの解析

血管弛緩反応は 10^{-7} M ET-1 による収縮力を 100 % とした時の割合を、抑制率 (%) として示した。各データは mean \pm S.E. で表し、有意差検定は Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。

<実験結果>

1) ウサギ胸部大動脈における ISO 誘発弛緩反応に対する各薬物の影響

ウサギ胸部大動脈において ISO は、濃度依存的に血管を弛緩させた (fig. 12-1)。nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M)、ANP (10^{-10} - 10^{-8} M)、CD-349 (10^{-9} - 10^{-5} M) および 8-Br-cyclic GMP (3×10^{-6} - 3×10^{-4} M) は、この ISO 誘発血管弛緩を濃度依存的に増強した。(fig. 12-1-3)。しかし、nifedipine (10^{-5} M) および nicardipine (10^{-5} M) はこの ISO 誘発血管弛緩を全く増強しなかった (fig. 12-4)。

2) ウサギ胸部大動脈における nitroglycerin および CD-349 の ISO 誘発血管弛緩増強作用に対する methylene blue および oxyhemoglobin の影響

Methylene blue (10^{-5} M, soluble guanylate cyclase inhibitor) および oxyhemoglobin (10^{-5} M, nitric oxide binding protein) は nitroglycerin (10^{-5} M) および CD-349 (10^{-5} M) の ISO 誘発血管弛緩増強作用を拮抗した (fig. 12-5)。

3) ウサギ胸部大動脈における FSK 誘発弛緩反応に対する CD-349 の影響

ウサギ胸部大動脈において FSK は、濃度依存的に血管を弛緩させた (fig. 12-6)。CD-349 (10^{-6} , 10^{-5} M) は、この FSK 誘発血管弛緩を濃度依存的に増強した (fig. 12-6)。

4) 血管中 cyclic nucleotide 量に対する作用

ウサギ胸部大動脈における血管中 cyclic GMP および cyclic AMP の basal level は、 0.049 ± 0.01 pmol/mg tissue (n=5) および 0.37 ± 0.03 pmol/mg tissue (n=5) であった。この時、CD-349 (10^{-7} - 10^{-5} M) は、血管中 cyclic GMP 量を濃度依存的に増加させたが、cyclic AMP は、増加させなかった (table 12-1)。また、ISO (10^{-5} M) は、血管中 cyclic AMP 濃度は 0.37 ± 0.03 pmol/mg tissue から 0.47 ± 0.01 pmol/mg tissue とわずかに増加させたが、この増加の程度は、CD-349 (10^{-5} M) または 8-Br-cyclic GMP (3×10^{-5} M) の処置により、 0.62 ± 0.08 pmol/mg tissue (n=5) および 0.63 ± 0.07 pmol/mg tissue (n=5) となり、著明な増加作用を示した (table 12-2)。

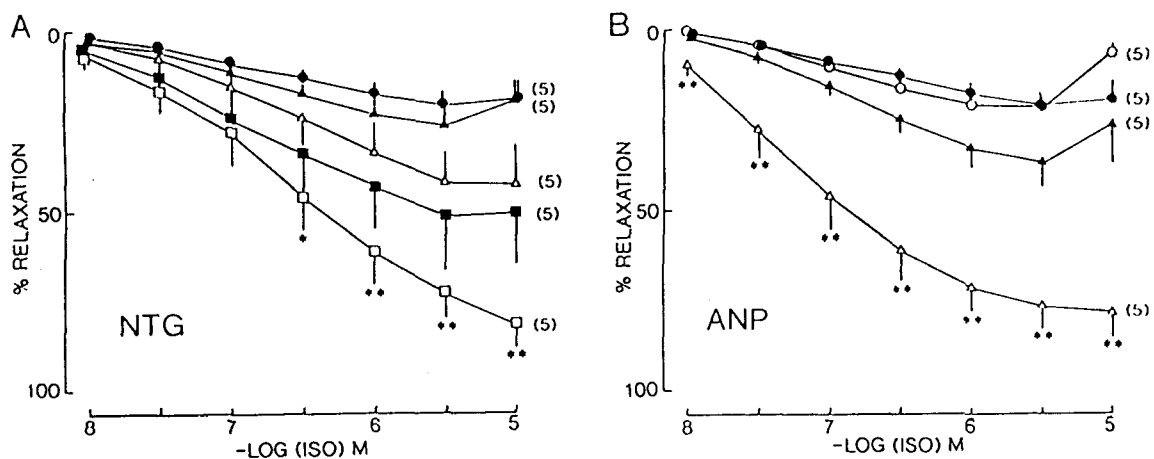


Fig. 12-1 (A) Effects of nitroglycerin (NTG) (\blacktriangle , 10^{-8} M), (\triangle , 10^{-7} M), (\blacksquare , 10^{-6} M), (\square , 10^{-5} M) on isoproterenol(\bullet , control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. (B) Effects of atrial natriuretic peptide (ANP) (\circ , 10^{-10} M), (\blacktriangle , 10^{-9} M), (\triangle , 10^{-8} M) on isoproterenol(\bullet , control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to nitroglycerin and ANP for 15 min, and 10^{-7} - 2×10^{-7} endothelin-1 was then added to the bath. The results are expressed as the percentage decrease of contractile force induced by endothelin-1 and the means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

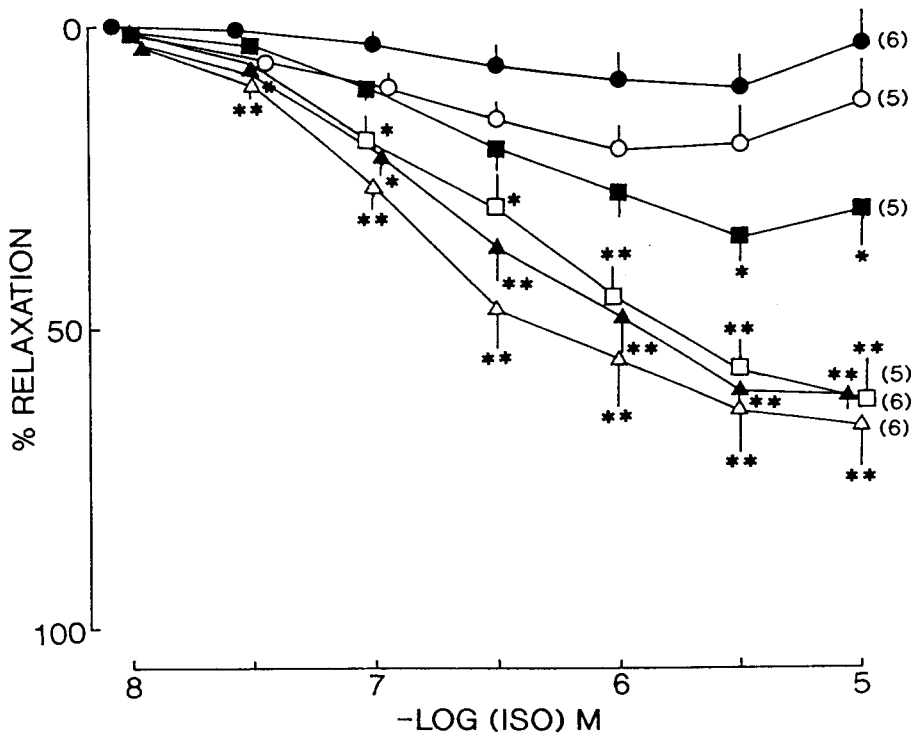


Fig. 12-2 Effects of CD-349 (○, 10^{-9} M), (■, 10^{-8} M), (□, 10^{-7} M), (▲, 10^{-6} M), (△, 10^{-5} M) on isoproterenol(●, control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to CD-349 for 15 min, and 10^{-7} - 2×10^{-7} endothelin-1 was then added to the bath. The results are expressed as the percentage decrease of contractile force induced by endothelin-1 and the means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

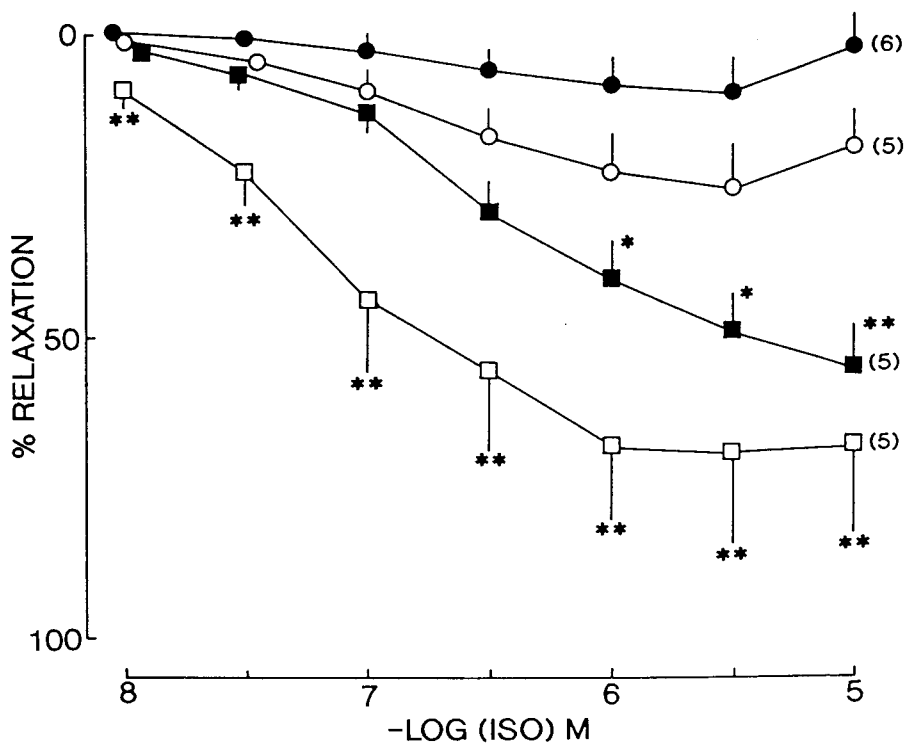


Fig. 12-3 Effects of 8-Br-cyclic GMP (○, 3×10^{-6} M), (■, 3×10^{-5} M), (□, 3×10^{-4} M) on isoproterenol(●, control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to 8-Br-cyclic GMP for 15 min, and 10^{-7} - 2×10^{-7} endothelin-1 was then added to the bath. The results are expressed as the percentage decrease of contractile force induced by endothelin-1 and the means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

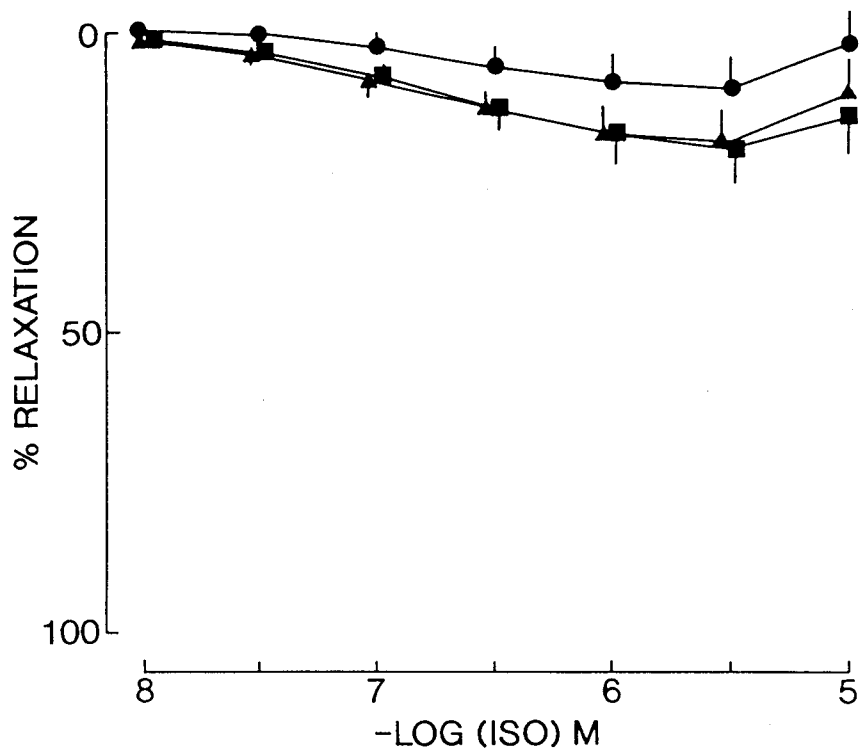


Fig. 12-4 Effects of nifedipine (▲, 10^{-5} M), nicardipine (■, 10^{-5} M) on isoproterenol (●, control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to nifedipine and nicardipine for 15 min, and 10^{-7} endothelin-1 was then added to the bath. The results are expressed as the percentage decrease of contractile force induced by endothelin-1 and the means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals.

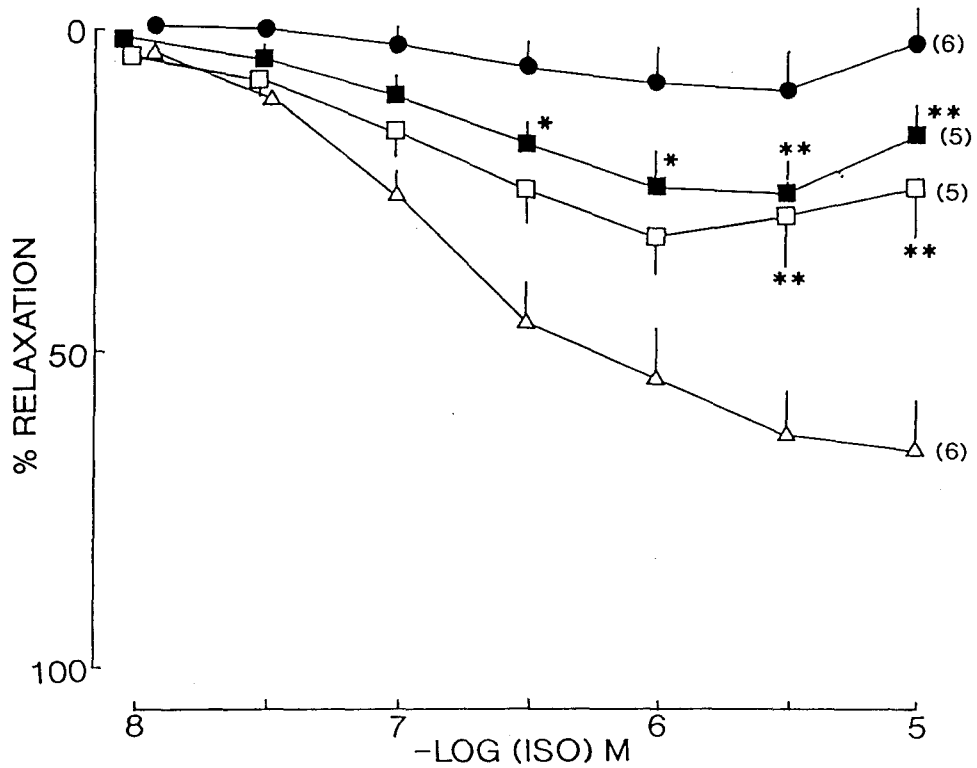


Fig. 12-5 Effects of methylene blue (■, 10^{-5} M) and oxyhemoglobin (□, 10^{-5} M) on potentiating effects of CD-349 (Δ, 10^{-5} M) in isoproterenol-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to these agents for 15 min, and then 10^{-7} - 2×10^{-7} M endothelin-1 was added to the bath. Results are expressed as percentage decrease tension of contractile force induced by endothelin-1 and means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. significantly different vs. 10^{-5} M CD-349.

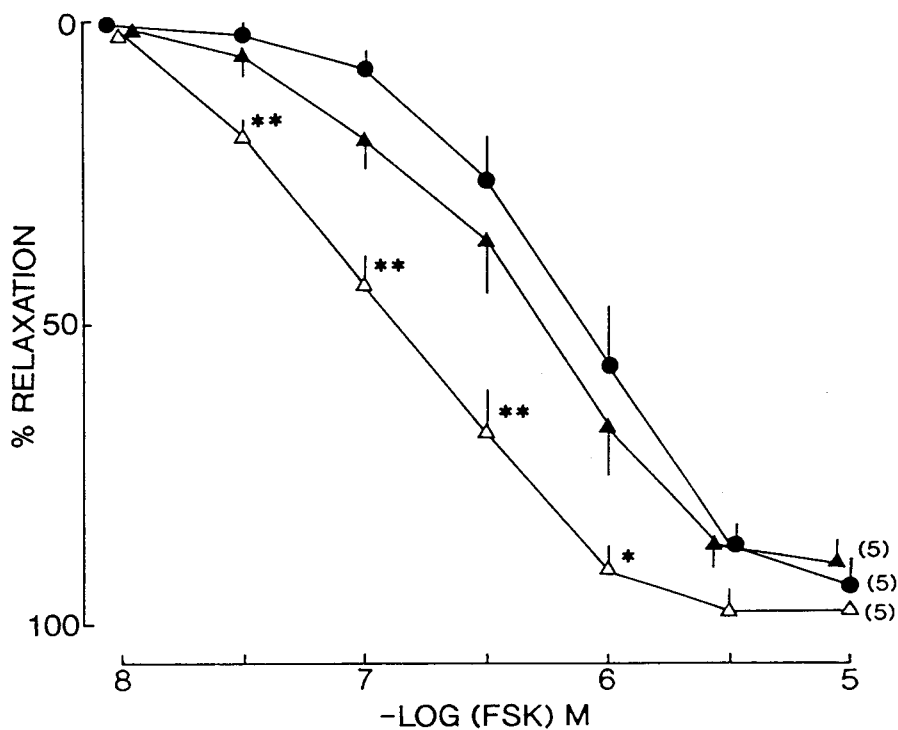


Fig. 12-6 Effects of CD-349 (▲, 10^{-7} M, △ 10^{-6} M) on forskolin (●, control)-induced relaxation responses of endothelium-denuded rabbit aorta. Aortic strips were exposed to CD-349 for 15 min, and 10^{-7} endothelin-1 was then added to the bath. The results are expressed as the percentage decrease of contractile force induced by endothelin-1 and the means \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

Table 12-1 Basal and CD-349-induced production of cyclic nucleotides in rabbit aorta without endothelium

Agents	cyclic AMP (pmol/mg tissue)	cyclic GMP (pmol/mg tissue)
None	0.37 ± 0.03 (n=5)	0.049 ± 0.01 (n=5)
CD-349 (10 ⁻⁷ M)	0.41 ± 0.05 (n=5)	0.072 ± 0.02 (n=5)
CD-349 (10 ⁻⁶ M)	0.33 ± 0.04 (n=5)	0.083 ± 0.03 (n=5)
CD-349 (10 ⁻⁵ M)	0.40 ± 0.04 (n=5)	0.103 ± 0.03* (n=4)

Values are means ± S.E. n, number of animals.

* P < 0.05 significantly different from control (none).

Table 12-2 Effects of CD-349 and 8-Br-cyclic GMP on isoproterenol-induced production of cyclic AMP in rabbit aorta without endothelium.

Agents	cyclic AMP (pmol/mg tissue)
None	0.37 ± 0.03 (n=5)
ISO (10 ⁻⁵ M)	0.47 ± 0.01 (n=5)
ISO (10 ⁻⁵ M) + CD-349 (10 ⁻⁵ M)	0.62 ± 0.08* (n=5)
ISO (10 ⁻⁵ M) + 8-Br-cyclic GMP (3x10 ⁻⁵ M)	0.63 ± 0.07* (n=5)

Values are means ± S.E. n, number of animals.

ISO, isoproterenol. * P < 0.05 significantly different from control (none).

<考察>

本実験の結果から、cyclic GMP 増加薬は、ISO および FSK 誘発血管弛緩作用を濃度依存的に増強することが明らかとなった。この cyclic GMP による cyclic AMP 介在性血管弛緩作用の増強効果は、cyclic GMP による cyclic AMP の分解抑制に起因している可能性が示唆された。本報告は、血管平滑筋において、cyclic GMP が cyclic AMP の作用を増強するという最初の報告である。

ウサギ胸部大動脈における ISO 誘発血管弛緩作用は、nitroglycerin、ANP、CD-349 等の cyclic GMP 増加薬によって有意に増強された。また、cyclic GMP analog である 8-Br-cyclic GMP によっても同様の結果が得られた。さらに、nitroglycerin および CD-349 の ISO 誘発血管弛緩増強作用は、soluble guanylate cyclase 阻害薬である methylene blue⁴⁷⁾ および NO 結合タンパク質である oxyhemoglobin⁴⁷⁾ によって拮抗された。このことから、cyclic GMP 増加薬は、 β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩作用を増強することが確認された。本実験の結果から、生体内物質である ANP も、ISO 誘発血管弛緩作用を低濃度から増強することが明らかとなった。従って、ANP は、生体内において adrenaline などによる β -adrenaline 受容体介在性弛緩反応を調節している可能性も示唆された。

CD-349 は、ウサギ胸部大動脈における FSK 誘発弛緩反応も濃度依存的に増強したことから、CD-349 は、 β -adrenaline 受容体介在性弛緩作用だけではなく、FSK 誘発血管弛緩作用をも増強することが明らかとなった。FSK は、 β -adrenaline 受容体を介さずに、adenylate cyclase の触媒部位を直接活性化することによって、cyclic AMP を増加させることから⁴³⁾、cyclic GMP は、cyclic AMP 介在性の血管弛緩作用を増強することが示唆された。

血管中 cyclic nucleotide の定量結果より、CD-349 および 8-Br-cyclic GMP は、ISO による cyclic AMP の増加を著明に増強させたことから、cyclic GMP は、ISO による cyclic AMP 量を増加させて、ISO による血管弛緩作用を増強している可能性が示唆された。

近年、血小板においては、ニトロ化合物が、cyclic AMP 増加薬による血小板凝集阻害作用を増強することが報告されている¹⁰⁸⁾。この増強作用は、ニトロ化合物が cyclic GMP を増加させ、cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase (Type III PDE) を阻害することによっていると報告されている¹⁰⁸⁾。血管平滑筋においては、このような増強作用に関しては報告がないが、cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase (Type III PDE) は存在することが報告さ

れている^{109,110)}。従って、本実験においても、cyclic GMP が Type III PDE を阻害して、cyclic AMP 介在性血管弛緩作用を増強している可能性が考えられた。

著者は、第2章において、ISO 誘発血管弛緩作用は内皮細胞が存在する際に強く発現することを見いだした⁵²⁾。血管内皮細胞からは、常時 EDRF (NO) が遊離されており血管中 cyclic GMP 含量は、内皮細胞存在時の方が内皮細胞非存在時より、高いことが報告されている⁴⁷⁾。従って、内皮細胞存在時には、血管中 cyclic GMP が、Type III PDE を阻害することによって、ISO 誘発血管弛緩作用が強く発現させる可能性があることを示唆された。また、著者は第2および3章において STZ 誘発糖尿病ラットおよび自然発症糖尿病 WBN/Kob ラットのいずれの I 型糖尿病モデルにおいても胸部大動脈において β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応が著明に減弱していることを明らかにした^{52,92)}。さらに、高血圧症動物においても血管平滑筋における β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩反応が著明に減弱していることが報告されている³⁹⁻⁴¹⁾。本実験の結果から、cyclic GMP 増加薬は I 型糖尿病時および高血圧症時に認められる β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩反応を増強し、その機能を回復させる可能性があることが示唆された。

第13章 Protein kinase C 介在性血管収縮作用に及ぼす cyclic GMP 増加薬の影響

近年、血管平滑筋における norepinephrine, angiotensin II および endothelin 等の agonist による血管収縮機構においては、phosphatidylinositol (PI) 代謝回転が重要な役割を演じていることが報告されている^{32,33)}。血管収縮薬が受容体に結合すると細胞膜のリン脂質である PI が加水分解され、inositol trisphosphate (IP3) および diacylglycerol (DG) が生成される³⁴⁾。この DG は、protein kinase C (PKC) を活性化し、血管収縮を惹起すると考えられている^{32,33)}。

Phorbol ester は、この PKC を外因性に活性化することが知られている^{86,87)}。第8章における検討から、著者は、SHRSP の門脈平滑筋において、phorbol ester 誘発血管収縮反応が対照群と比較して著明に亢進していることを見いだした¹¹¹⁾。同様の現象は、高血圧症自然発症ラットの腸間膜動脈においても認められている^{88,89)}。また、STZ 誘発糖尿病ラットの腸間膜動脈においても、同様に、phorbol ester 誘発血管収縮反応が対照群と比較して著明であることが報告されている¹¹²⁾。しかし、phorbol ester による protein kinase C 介在性血管収縮に対する cyclic GMP 増加薬の効果に関する報告はない。以上のことから、本章では血管平滑筋における phorbol ester 誘発血管収縮に対する cyclic GMP 増加薬の効果を検討した。

<実験方法>

1) 使用動物

実験には、雄性日本白色ウサギ（体重 2.0-4.8 kg）を用いた。

2) 栄養液の調製

栄養液には、一部修正した Krebs-Henseleit solutionを用いた。栄養液の組成は、NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25.0 mM および glucose 11.1 mM とした。栄養液は、調製後、95 % O₂-5 % CO₂の混合ガスを常時通気し、37 °Cに加温した。

3) ウサギ胸部大動脈螺旋状標本の作製

ウサギは、pentobarbital (40 mg/kg, i. v.) で麻酔した後、総頸動脈より脱血致死させた。その後大動脈弓部より横隔膜までの胸部大動脈をすばやく摘出し、95 % O₂-5 % CO₂ の混合ガスを通気した栄養液中に入れ、血管周囲の余分な脂肪組織や結合組織を取り除いた。その後、先鋭ピンセットおよび先鋭ハサミを用い、細心の注意を払って、幅 2 mm、長さ 15 mm の螺旋状標本を作製した。尚、EDRF の影響を除くため内皮細胞は、すべて綿棒にて剝離した状態で実験を行なった。標本の両端を木綿糸で結んだ後、一端をオルガンバス内の支柱に固定し、他端を張力測定用 force-displacement transducer (TB-612T, 日本光電) に接続して、等尺性張力を測定した。尚、オルガンバス内には、栄養液を満たし、95 % O₂-5% CO₂ の混合ガスを通気して、37 °Cに保温した。標本には 2 gの静止張力を負荷して、60-90 分間ブレインキュベーションした後に、実験を行なった。この間、オルガンバス内の栄養液は、20 分毎に交換した。

4) 薬物反応性の検討

60-90 分間のブレインキュベーションの後、血管を、10⁻⁷ M の norepinephrine (NE) で収縮させ、反応が安定した後に、10⁻⁵ M の acetylcholine (ACh) を投与した。この際、ACh (10⁻⁵ M) により弛緩反応が 75 % 以上認められることをもって、機能的な内皮細胞の存在を確認した。内皮細胞

胞の存在を確認した後、64 mM KCl によって血管を収縮させた。その後、phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu, 10^{-6} M) により血管を収縮させた。Nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M)、atrial natriuretic peptide (ANP, 10^{-10} - 10^{-7} M)、CD-349 (10^{-8} - 10^{-5} M)、nifedipine (10^{-5} M)、nicardipine (10^{-5} M) および diltiazem (10^{-5} M) の影響を検討する際には、これらの薬物を15分間前処置した後に、PDBu を投与した。さらに、methylene blue の影響を検討する際には、methylene blue は、nitroglycerin または CD-349 と同時に投与した。

5) 使用薬物

norepinephrine hydrochloride (Sigma)

nifedipine hydrochloride (Sigma)

nicardipine hydrochloride (Sigma)

diltiazem hydrochloride (Sigma)

methylene blue (Sigma)

phorbol 12,13 dibutyrate (Sigma)

nitroglycerin (日本化薬)

acetylcholine chloride (第一製薬)

atrial natriuretic peptide (ペプチド研究所)

CD-349 は、大正製薬総合研究所で合成した。

6) データの解析

血管収縮は各血管より得られた 64 mM KCl 収縮を 100% とした時の血管収縮率 (%) で示した。各データは mean \pm S.E. で表し、有意差検定は Bartlett 検定で各群の分散を調べ、等分散ならば一元配置分散分析を行い、有意であれば Tukey 検定で有意差を検定した。

<実験結果>

1) ウサギ胸部大動脈における PDBu 収縮に対する各薬物の影響

ウサギ胸部大動脈における 64 mM KCl 誘発収縮反応は、 1.69 ± 0.14 g であった。PDBu (10^{-6} M) は、血管を収縮させたが、収縮は非常に緩徐であり、約 90 分後にプラトーレベルに達した。この時の収縮力は、64 mM KCl に対して、 115.0 ± 9.2 % であった。Nitroglycerin (10^{-8} - 10^{-5} M)、atrial natriuretic peptide (ANP, 10^{-10} - 10^{-7} M)、CD-349 (10^{-8} - 10^{-5} M) は濃度依存的に PDBu 誘発収縮を抑制した (fig. 13-1,2)。しかし、nifedipine (10^{-5} M), nicardipine (10^{-5} M), diltiazem (10^{-5} M) は、PDBu 誘発収縮を全く抑制しなかった (fig. 13-3)。

2) ウサギ胸部大動脈における nitroglycerin および CD-349 の PDBu 収縮抑制効果に対する methylene blue の影響

Nitroglycerin (10^{-7} , 10^{-5} M) および CD-349 (10^{-7} , 10^{-5} M) の PDBu 収縮抑制効果は、methylene blue (10^{-5} M, soluble guanylate cyclase 阻害薬) の処置によりそれぞれ拮抗された (fig. 13-4)。

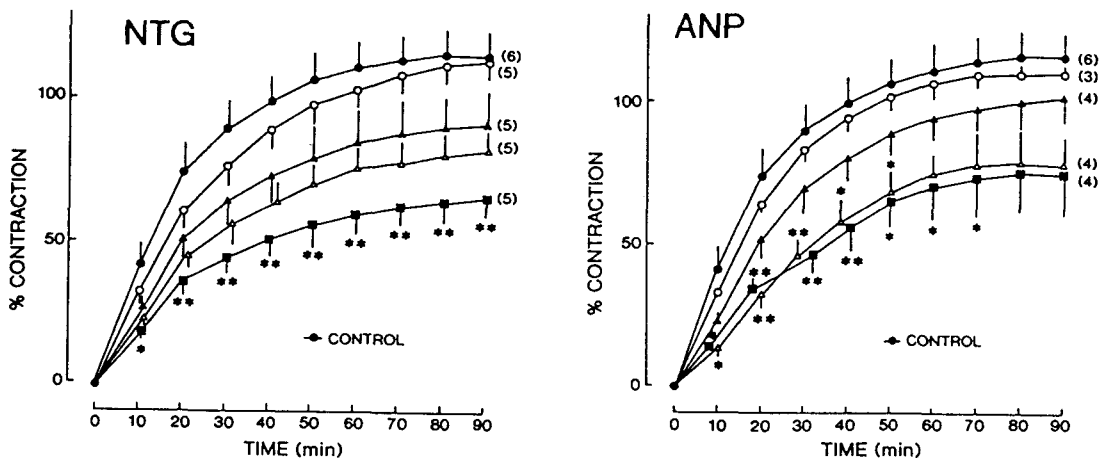


Fig. 13-1 Contractile responses to 10^{-6} M phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu) with nitroglycerin (NTG) (\circ , 10^{-8} M), (\blacktriangle , 10^{-7} M), (\triangle , 10^{-6} M), (\blacksquare , 10^{-5} M), and atrial natriuretic peptide (ANP) (\circ , 10^{-10} M), (\blacktriangle , 10^{-9} M), (\triangle , 10^{-8} M), (\blacksquare , 10^{-7} M) in endothelium-intact rabbit aorta. Aortic strips were exposed to these agents for 15 min; 10^{-6} M PDBu was then added to the bath. Results expressed as a percentage of response to 64 mM KCl and are the mean \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

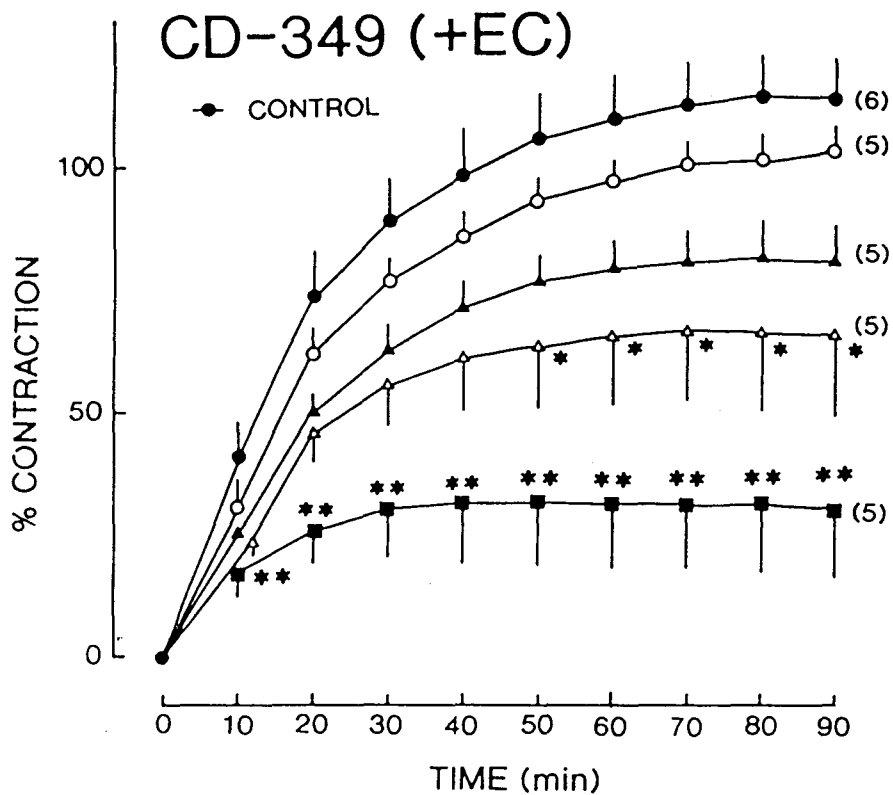


Fig. 13-2 Contractile responses to 10^{-6} M phorbol 12, 13 dibutyrate (PDBu) with CD-349 (O, 10^{-8} M), (\blacktriangle , 10^{-7} M), (\triangle , 10^{-6} M), (\blacksquare , 10^{-5} M) in endothelium-intact rabbit aorta. Aortic strips were exposed to these agents for 15 min; 10^{-6} M PDBu was then added to the bath. Results expressed as a percentage of response to 64 mM KCl and are the mean \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

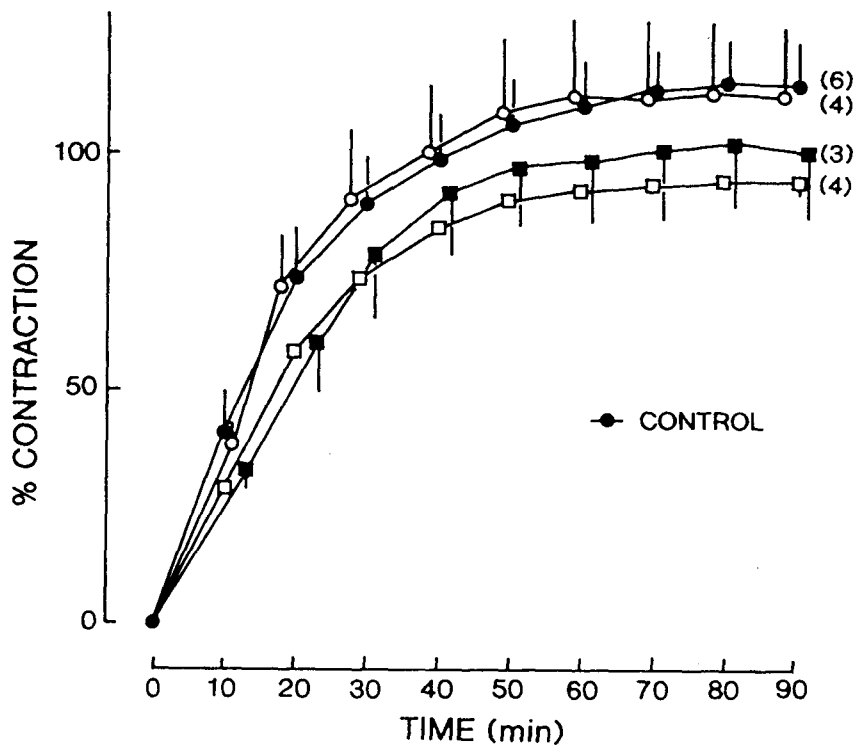


Fig. 13-3 Effects of 10^{-5} M nifedipine (□), 10^{-5} M nicardipine (■) and 10^{-5} M diltiazem (○) on 10^{-6} M phorbol dibutyrate (PDBu)-induced contraction of endothelium-intact rabbit aorta. Results are expressed as a percentage of response to 64 mM KCl and are the mean \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals.

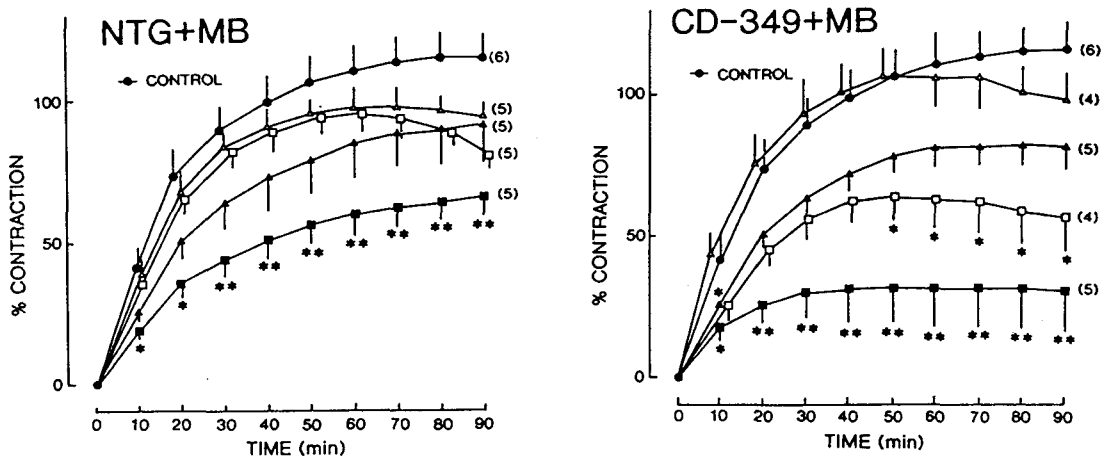


Fig. 13-4 Effects of methylene blue (MB) on the inhibitory effects of nitroglycerin (NTG) (\blacktriangle , 10^{-7} M), (\blacksquare , 10^{-5} M), (\triangle , 10^{-7} M + MB 10^{-5} M), (\square , 10^{-5} M + MB 10^{-5} M) and CD-349 (\blacktriangle , 10^{-7} M), (\blacksquare , 10^{-5} M), (\triangle , 10^{-7} M + MB 10^{-5} M), (\square , 10^{-5} M + MB 10^{-5} M) in endothelium-intact rabbit aorta. Aortic strips were exposed to these agents for 15 min, and 10^{-6} M phorbol 12, 13 dibutyrate was added to the bath. Results are expressed as a percentage of response to 64 mM KCl and are the mean \pm S.E. Numbers in parentheses are the number of animals. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, significantly different as compared with control.

<考察>

本実験の結果から、cyclic GMP 増加薬は、ウサギ胸部大動脈において、PDBu 誘発血管収縮を濃度依存的に抑制することが明らかとなった。この PDBu 血管誘発収縮抑制作用は、Ca 拮抗薬である nifedipine, nicardipine および diltiazem といった代表的な血管拡張薬には認められない作用であった。

ウサギ胸部大動脈における PDBu 誘発血管収縮は、Ca 拮抗性を有する nifedipine では全く抑制されなかったことから、ウサギ胸部大動脈においては、PDBu 誘発血管収縮作用は、膜電位依存性 Ca^{2+} -channel からの Ca^{2+} の流入は、関与していないことが明らかとなった。Nitroglycerin および CD-349 の PDBu 誘発収縮抑制作用は、methylene blue (soluble guanylate cyclase 阻害薬⁴⁷⁾) により抑制されたことから、これらの作用は、guanylate cyclase の活性化を介した血管中 cyclic GMP の増加により発現されている可能性が示唆された。現在までのところ、どのように cyclic GMP が protein kinase C 介在性の血管収縮作用を抑制するかは不明であるが、cyclic GMP が protein kinase C 活性を抑制している可能性が考えられた。第8章での検討から、著者は SHRSP の門脈平滑筋における phorbol ester 誘発血管収縮の反応性が亢進していることを見いだした¹¹¹⁾。また、SHR の腸間膜動脈^{88, 89)} および STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈¹¹²⁾ においても phorbol ester 誘発血管収縮の反応性が有意に亢進していることが報告されている。以上のことから、高血圧症動物および I 型糖尿病動物いずれの実験動物モデルにおいても、血管平滑筋における protein kinase C 活性が上昇している可能性があり、これらのことは cyclic GMP 増加薬は、高血圧症時および糖尿病時に機能亢進が認められている血管平滑筋の protein kinase C 介在性血管収縮作用に対して効率的に抑制する可能性があることが示唆する。

総括

- 1) 糖尿病時および高血圧症時には種々の血管障害を高頻度に伴うことが知られている。これらの発症機序は未だ明らかとはなっていないが、その一部は、血管平滑筋および血管内皮細胞の機能変化に起因すると考えられる。そこで実験的糖尿病モデルおよび自然発症高血圧モデル動物より種々血管を摘出し、薬物感受性変化を検討して以下のような結論を得た。
 - 1-1) Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈においては α -adrenaline 受容体介在性の収縮反応が亢進していた。この反応性亢進には膜電位依存性 Ca^{2+} -channel および phosphatidylinositol 代謝回転の活性化が関与していることが明らかとなった。
 - 1-2) STZ 誘発糖尿病ラットおよび自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈における β -adrenaline 受容体介在性の弛緩反応が減弱していた。この反応性減弱には、 β -adrenaline 受容体の数または親和性の変化に起因していること示唆された。また、この過程において、isoproterenol (ISO) 誘発血管弛緩作用が、一部、血管内皮細胞に依存することが明らかとなった。
 - 1-3) STZ 誘発糖尿病ラットおよび自然発症糖尿病ラットの胸部大動脈において、内皮細胞依存性弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。これは、EDRF (NO) 産生または放出の減少に起因することが示唆された。また、この過程で糖尿病発症以前の自然発症糖尿病ラットにおいても血管内皮細胞依存性弛緩作用の減弱が認められたことから、自然発症糖尿病ラットにおける血管内皮機能障害は、血糖値に依存せず遺伝的な現象である可能性が示唆された。
 - 1-4) SHRSP の頸動脈における内皮細胞依存性弛緩作用が減弱していることが明らかとなった。これは、糖尿病時と同様に EDRF (NO) 産生または放出の減少に起因することが示唆された。
 - 1-5) SHRSP の門脈平滑筋における protein kinase C 介在性血管収縮作用の亢進が認められ、高血圧症時の血管平滑筋においては protein kinase C 活性が亢進していることが明らかとなった。

- 1-6) STZ 誘発糖尿病ラットの胸部大動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能低下および SHRSP の頸動脈における ATP-sensitive K⁺-channel の機能亢進が認められた。

以上のように糖尿病時（I型糖尿病モデル）および高血圧症時の血管においては、胸部大動脈における血管収縮性は上昇し、血管拡張性は減弱する傾向にあった。特に、糖尿病時および高血圧症時の血管に共通した血管機能異常としては、血管内皮細胞依存性弛緩作用の減弱が認められ、この血管内皮機能障害が、種々合併症の引金になっている可能性が示唆された（図 I、II、IV）。

- 2) Cyclic GMP 増加薬の血管弛緩反応における薬理学的特性についても検討し、糖尿病時および高血圧症時における血管平滑筋の機能変化との関連を考察した。これらの検討によって、以下のような結論を得た。

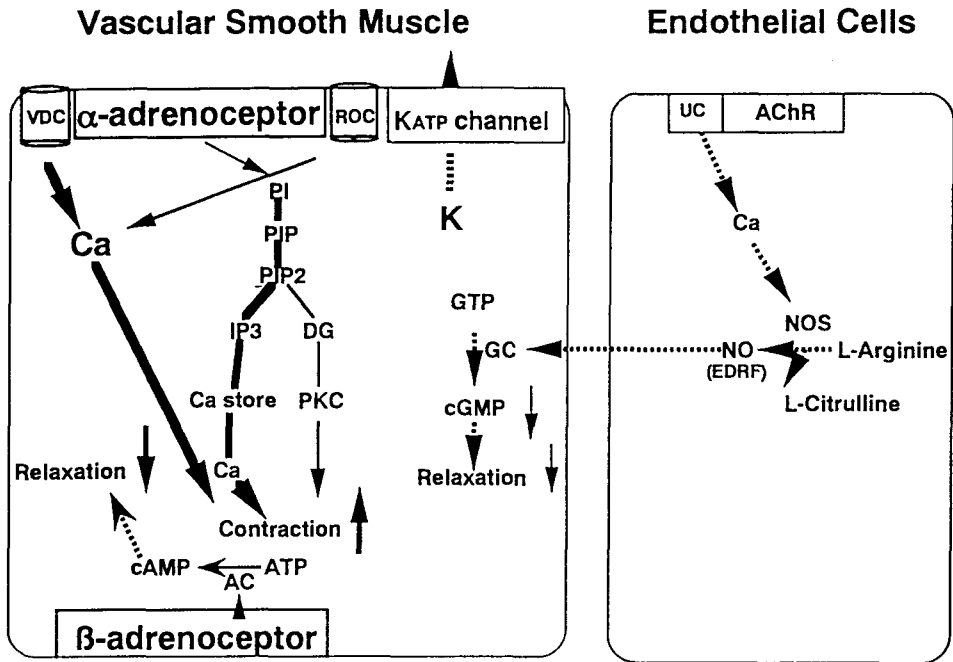
2-1) Cyclic GMP 増加薬は、 α -adrenaline 受容体介在性の血管収縮作用を、濃度依存的に抑制することが示唆された。この収縮抑制には受容体制御 Ca²⁺-channel および phosphatidylinositol 代謝回転の抑制が関与していることが示唆された。糖尿病時および高血圧時には α -adrenaline 受容体介在性血管収縮作用が亢進していることから、病態時には、cyclic GMP 増加薬が有用である可能性が示唆された。

2-2) Cyclic GMP 増加薬は、 β -adrenaline 受容体介在性の血管弛緩作用を、濃度依存的に増強することを見いだした。この弛緩反応の増強は、cyclic GMP による cyclic GMP-inhibitable cyclic AMP phosphodiesterase (Type III PDE) 阻害作用に起因している可能性が示唆された。糖尿病時および高血圧症時には β -adrenaline 受容体介在性血管弛緩作用が減弱していることから、病態時には、cyclic GMP 増加薬が有用である可能性が示唆された。

2-3) Cyclic GMP 増加薬は、phorbol ester による protein kinase C 介在性血管収縮作用を濃度依存的に抑制することを見いだした。この収縮抑制のメカニズムは不明であるが、糖尿病時および高血圧症時には protein kinase C 介在性血管収縮作用が亢進していることから、病態時には、cyclic GMP 増加薬が有用である可能性が示唆された。

以上のことから cyclic GMP 増加薬は、病態時に認められた機能異常を改善する作用を有していた。これらの作用は、代表的な血管弛緩拡張薬であるカルシウム拮抗薬には全く認められない作用であり、cyclic GMP 増加薬の血管弛緩機序における特異的な作用であることが明らかとなった（図Ⅲ、Ⅳ）。

Blood vessels in diabetes

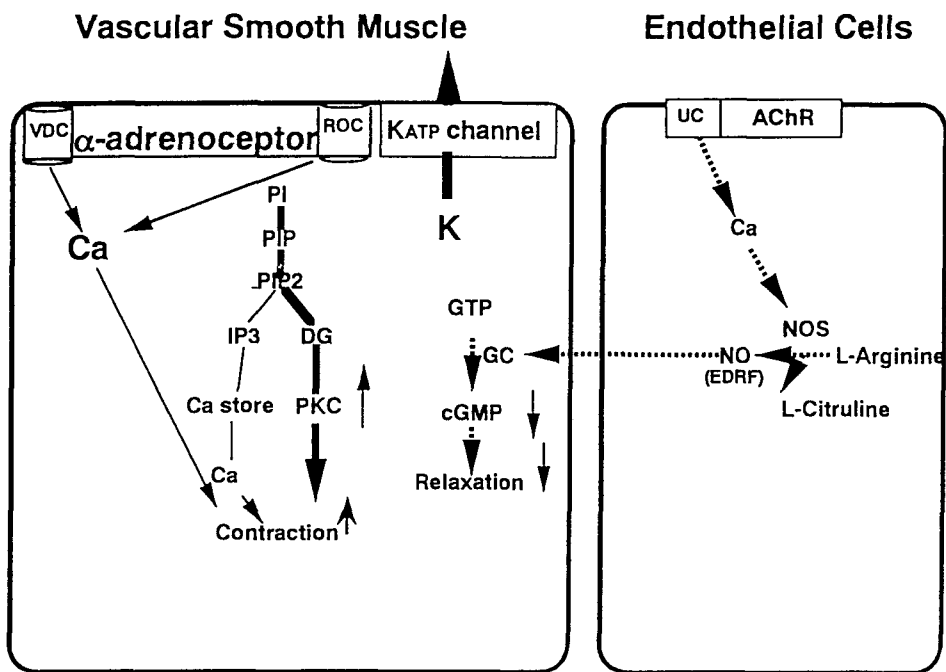


- VDC : voltage-dependent Ca channel
- ROC : receptor-operated Ca channel
- K ATP channel : ATP-sensitive K channel
- PI : phosphatidylinositol
- PIP : phosphatidylinositol monophosphate
- PIP2: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
- IP3 : inositol trisphosphate
- DG : diacylglycerol
- PKC: protein kinase C
- ATP : adenosine triphosphate
- GTP : guanosine triphosphate
- AC : adenylate cyclase
- GC : guanylate cyclase
- cAMP : adenosine 3'5' cyclic monophosphate
- cGMP : guanosine 3'5' cyclic monophosphate

- AChR: acetylcholine receptor
- UC : unidentified Ca channel
- NO: nitric oxide
- NOS : nitric oxide synthase

☒ I

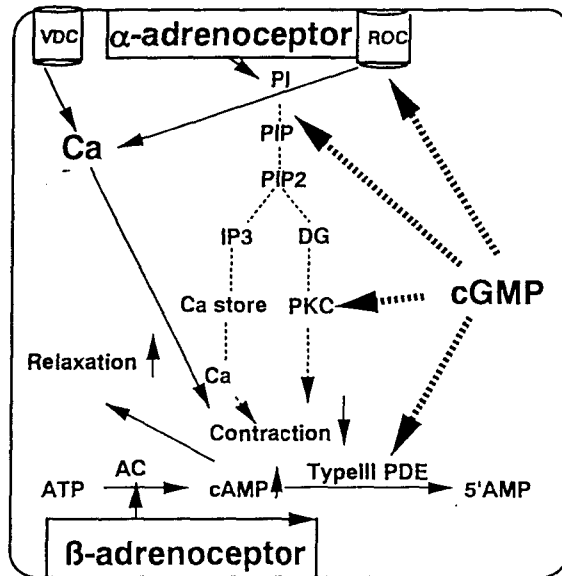
Blood vessels in hypertension



VDC : voltage-dependent Ca channel
 ROC : receptor-operated Ca channel
 K ATP channel : ATP-sensitive K channel
 PI : phosphatidylinositol
 PIP : phosphatidylinositol monophosphate
 PIP2: phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate
 IP3 : inositol trisphosphate
 DG : diacylglycerol
 PKC: protein kinase C
 GTP : guanosine triphosphate
 GC : guanylate cyclase
 cGMP : guanosine 3'5' cyclic monophosphate

AChR: acetylcholine receptor
 UC : unidentified Ca channel
 NO: nitric oxide
 NOS : nitric oxide synthase

Role of cGMP in vascular smooth muscle



VDC : voltage-dependent Ca channel

ROC : receptor-operated Ca channel

PI : phosphatidylinositol

PIP : phosphatidylinositol monophosphate

PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate

IP₃ : inositol trisphosphate

DG : diacylglycerol

PKC : protein kinase C

ATP : adenosine triphosphate

AC : adenylyl cyclase

cAMP : adenosine 3'5' cyclic monophosphate

5' AMP : adenosine 5' monophosphate

cGMP : guanosine 3'5' cyclic monophosphate

Type III PDE : cGMP-inhibitable cAMP phosphodiesterase

☒ III

糖尿病時および高血圧症時における血管平滑筋の機能変化 —血管内皮細胞障害と関連して—

	STZ誘発糖尿病ラット (化学物質誘発糖尿病)	WBN/Kobラット (自然発症糖尿病)	SHRSP (脳卒中易発症性高血圧)	cGMP増加薬	Ca拮抗薬
α -adrenaline 受容体介在性収縮	↑↑	↑	文献 ↑↑	抑制	No effect
β -adrenaline 受容体介在性弛緩反応	↓↓	↓↓	文献 ↓↓	増強	No effect
血管内皮細胞依存性弛緩反応	↓↓	↓↓	↓↓	代償	No effect
Protein kinase C 介在性血管収縮	文献 ↑↑	文献 報告なし	↑↑	抑制	No effect
ATP-sensitive K-channel 活性	↓↓	—	↑↑	unknown	No effect

図Ⅳ

謝辞

終りに臨み、本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜り、さらに本論文の御校閲を頂きました星薬科大学学長 粕谷 豊先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、終始温かい御指導と適切な御助言を賜りました星薬科大学機能形態研究室 助教授 鎌田 勝雄先生に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、本論文の御校閲を頂きました星薬科大学薬理学教室教授 三澤 美和先生に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、本論文の御校閲を頂きました星薬科大学薬理学教室助教授 鈴木 勉先生に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を賜りました大正製薬株式会社 代表取締役 上原 明社長、常務取締役 大関 正弘博士に謹んで感謝申し上げます。また、温かい御支援と御鞭撻を賜りました大正製薬株式会社 総合研究所 医薬開発研究部門統括部長 花田 和紀博士に謹んで感謝申し上げます。また、終始温かい御支援と御鞭撻を賜りました大正製薬株式会社 総合研究所 医薬開発研究部門 第2 薬理研究部部长 小友 進博士に謹んで感謝申し上げます。また、御助言と御鞭撻を賜りました大正製薬株式会社 医薬開発研究部門 薬理研究部 土田 勝晴博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、ご支援とご協力を賜りました山浦（澤田）明子女史に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、ご支援とご協力を賜りました大正製薬 総合研究所 医薬開発研究部門 田中 誠博士、奥山 茂 博士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、ご支援とご協力を賜りました大正製薬 総合研究所 医薬開発研究部門 金子 勝義氏、高橋 健三博士に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、適切な英文校閲を賜りました早稲田大学人間科学部 助教授 Robert Gray 先生に謹んで感謝申し上げます。

本研究に際し、御助言と御指導を賜りました星薬科大学薬理学教室 亀井 淳三博士に心よりお礼申し上げます。

本研究に際し、御助言と御指導を賜りましたヤマサ醤油 畔蒜 藤一博士に心よりお礼申し上げ

ます。

本研究に際し、ご支援とご協力を賜りました大正製薬株式会社 総合研究所 医薬開発研究部門
薬理研究部の皆様に心より感謝申し上げます。

本研究に際し、ご支援とご協力を賜りました星薬科大学 薬理研究学教室の皆様に心より感謝申
上げます。

掲載雑誌目録

第1章の内容は、J. Pharmacobio-Dyn. 11, 707-713 (1988) に下記の表題で掲載されたものである。

Mechanisms of increased responses of the aorta to alpha-adrenoceptor agonists in streptozotocin-induced diabetic rats.

第2章の内容は、J. Pharmacol. Exp. Ther. 249, 890-894 (1989) に下記の表題で掲載されたものである。

Involvement of endothelial cells in relaxation and contraction responses of the aorta to isoproterenol in naive and streptozotocin-induced diabetic rats.

第3章の内容は、Life Sciences 50, 1363-1369 (1992) に下記の表題で掲載されたものである。
Changes in responsiveness of the aorta to vasorelaxant agents in genetically diabetic rats. A study in WBN/KOB rats.

第4章の内容は、Br. J. Pharmacol. 97, 614-618 (1989) に下記の表題で掲載されたものである。

Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats.

第5章の内容は、Am. J. Physiol. 262, H1104-H1109 (1992) に下記の表題で掲載されたものである。

Age-related changes in endothelium-dependent relaxation in aorta from genetically diabetic WBN/Kob rats.

第6章の内容は、*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 71, 297-300 (1993) に下記の表題で掲載されたものである。

Impairment of endothelium-dependent relaxation of superior mesenteric artery in genetically diabetic WBN/Kob rats.

第7章の内容は、*J. Pharm. Pharmacol.* 42, 763-766 (1990) に下記の表題で掲載されたものである。

Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in carotid arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

第8章の内容は、*Biochem. Biophys. Res. Commu.* 176, 1552-1555 (1991) に下記の表題で掲載されたものである。

Enhanced contractile effect of phorbol dibutyrate in portal veins from hypertensive rats.

第9章の内容は、*Eur. J. Pharmacol.* 166, 319-323 (1989) に下記の表題で掲載されたものである。

Functional changes in potassium channels in aortas from rats with streptozotocin-induced diabetes.

第10章の内容は、*Eur. J. Pharmacol.* 182, 209-210 (1990) に下記の表題で掲載されたものである。

Functional changes in potassium channels in carotid arteries from stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

第11章の内容は、Gen. Pharmacol. 21, 665-669 (1990) および Gen. Pharmacol. (1994) に下記の表題で掲載済および印刷中のものである。

Mechanisms of inhibitory effects of CD-349 and K⁺-channel activators on noradrenaline-induced contraction and changes in levels of cyclic GMP in rat aorta.
Role of cyclic GMP in inhibitory effects of CD-349 in isolated blood vessels.

第12章の内容は、Am. J. Physiol. 263, H1113-H1118 (1992) および Eur. J. Pharmacol. 249, 141-149 (1993) に下記の表題で掲載されたものである。

Effects of CD-349 and 8-BrcGMP on isoproterenol-induced relaxation in rabbit aorta precontracted with endothelin-1.

CD-832, a new dihydropyridine derivative with both nitrate-like and Ca²⁺ channel antagonist vasodilator activities.

第13章の内容は、J. Cardiovasc. Pharmacol. 17, 786-791 (1991) に下記の表題で掲載されたものである。

Protein kinase C-mediated contraction in rabbit aorta is inhibited by CD-349, a dihydropyridine derivative.

参考文献

- 1) Report of a WHO Study Group: Diabetes Mellitus, Technical Report Series, 727, p 9, World Health Organization, Geneva (1985).
- 2) National Diabetes Data Group, Diabetes, 28, 1039 (1979).
- 3) J.W. Craig, Postgrad. Med., 68, 25 (1980).
- 4) F.H. Epstein, Circulation, 36, 606 (1967).
- 5) K.W. Beach, D.E. Straundness, Diabetes, 29, 882 (1980).
- 6) J. Weinberger, V. Biscarra, M.K. Weisberg, J.H. Jacobson, Stroke, 14, 709 (1983).
- 7) J.H. Fuller, M.J. Shipley, G. Rose, R.J. Jarrett, H. Keen, Br. Med. J., 287, 867 (1983).
- 8) K.L. Mettinger, C.E. Soderstrom, J. Neiman, Acta Neurol. Scand., 70, 415 (1984).
- 9) M.J. Garcia, P.M. Mcnamara, T. Gordon, W.B. Kannell, Diabetes, 23, 105 (1974).
- 10) N.S. Dhalla, G.N. Pierce, I.R. Innes, R.E. Beamish, Can. J. Cardiol., 1, 263 (1985)
- 11) P.W. Stout, Diabetologia 16, 141 (1979).
- 12) 古屋大祐, 朝比奈崇介, 柏木厚典, 吉川隆一, J. Act. Oxyg. Free Radical 4, 185 (1993).
- 13) M.L. Tuck, N. Stern, J. Cardiovasc. Pharmacol., 19, (suppl) s8 (1992).
- 14) S. Pell, C.A. D'Alonzo, J. Am. Med. Assoc., 202, 104 (1967).
- 15) S. Katsuki, W. Arnold, F. Murad, J. Cyclic Nucleotide Res., 3, 239 (1977).
- 16) K.D. Scultz, K. Schlutz, G. Schultz, Nature, 265, 750 (1977).
- 17) T.M. Lincoln, Pharmacol. Ther., 41, 479 (1989).
- 18) P. Weidman, P. Berretta, C. Colli, G. Keusch, Z. Gluck, M. Mujagic, M. Grimm, A. Meiyer, W.H. Zeigler, Am. J. Med., 67, 779 (1979).
- 19) M.J. Brody, R.L. Dixon, Circ. Res., 14, 494 (1964).
- 20) M.P. Owen, G.O. Carrier, J. Pharmacol. Exp. Ther., 212, 253 (1980).
- 21) N.L. Scarborough, G.O. Carrier, J. Auton. Pharmacol., 3, 177 (1983).
- 22) N.L. Scarborough, G.O. Carrier, J. Pharmacol. Exp. Ther., 236, 603 (1984).

- 23) K.M. MacLeod, J.H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 63, 52 (1985).
- 24) S. Ramanadham, W.H. Lyness, T.E. Tenner, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 62, 418 (1984).
- 25) S. Sullivan, H.V. Sparks, *Am. J. Physiol.*, 236, H301 (1978).
- 26) M.A. Pfaffman, C.R. Ball, A. Darby, R. Hilman, *Am. J. Physiol.*, 242, H490 (1982).
- 27) R.J. Head, P.A. Longhurst, R.L. Panek, R.E. Stitzel, *Br. J. Pharmacol.*, 91, 275 (1987).
- 28) K.D. Meisheri, O. Hwang, C. Van Breemen, *J. Membr. Biol.*, 59, 91 (1981).
- 29) K.M. Dubowski, *Clin. Chem.*, 8, 215 (1962).
- 30) W.W. Fleming, D.P. Wesfall, I.S. Delande, J.B. Jeller, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 151, 339 (1972).
- 31) M. Schramm, G. Thomas, R. Towart, G. Franckowiak, *Nature*, 303, 536 (1983).
- 32) Y. Nishizuka, *Nature*, 308, 693 (1984).
- 33) Y. Nishizuka, *Science*, 233, 305 (1986).
- 34) Y. Takai, U. Kikkawa, K. Kaibuchi, Y. Nishizuka, *Adv. Cyclic Nucleotide Prot. Phospholyl. Res.*, 18, 119 (1984).
- 35) M.J. Berridge, R.F. Irvine, *Nature*, 312, 315 (1984).
- 36) E. Legan, B. Chernow, R. Parrillo, B.L. Roth, *Eur. J. Pharmacol.*, 110, 389 (1985).
- 37) K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, *J. Pharmacobio-Dyn.*, 11, 707 (1988).
- 38) W.R. Kukovetz, G. Poch, S. Holzmann, *Cyclic Nucleotides and relaxation of vascular smooth muscle. In Vasodilatation ed by P.M. Vanhoutte and I Leusen. p 339, Raven Press N.Y. (1981).*
- 39) M.S. Amer, *Science*, 179, 807 (1973).
- 40) M.L. Cohen, B.A. Berkowitz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 196, 396 (1976).
- 41) M. Asano, K. Aoki, T. Matsuda, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223, 207 (1982).
- 42) R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature*, 288, 373 (1980).
- 43) K.B. Seamon, J.W. Daly, *J. Cyclic Nucleotide Res.*, 7, 201 (1981).

- 44) I. Fridovich, P.O. Hagen, J.J. Murray, *News Physiol. Sci.*, 2, 61 (1987).
- 45) S.F. Steinberg, E.A. Jaffe, J.P. Bielezikian, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 325, 310 (1984).
- 46) W. Martin, G.M. Villani, D. Jothianandan, R.F. Furchgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 232, 708 (1986).
- 47) W. Martin, R.F. Furchgott, G.M. Villani, D. Jothianandan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237, 539 (1986).
- 48) R.R. Ruffolo, J.E. Waddel, E.L. Yaden, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 221, 309 (1982).
- 49) K. Kamata, A. Sakamoto, Y. Kasuya, *Jpn. J. Pharmacol.*, 47, 99 (1988).
- 50) S. Ramanadham, T.E. Tenner, *Eur. J. Pharmacol.*, 136, 377 (1987).
- 51) N.J. Christensen, *J. Clin. Invest.*, 51, 779 (1972).
- 52) K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 249, 890 (1989).
- 53) M. Tsuchitani, T. Saegusa, I. Narama, T. Nishikawa, T. Gonda, *Laboratory Animals*, 19, 200 (1985).
- 54) K. Nakama, K. Shichinose, K. Kobayashi, K. Naito, O. Uchida, Y. Yasuhara, M. Tobe, *Acta. Diabetologia Latina*, 22, 335 (1985).
- 55) P. Schoeffter, J.-C. Stoclet, *Eur. J. Pharmacol.*, 109, 275 (1985).
- 56) R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, P.D. Cherry, *Vasodilatation*. ed by P.M. Vanhoutte and I. Leusen p 49 Raven Press N.Y. (1981).
- 57) K. Kamata, T. Mori, K. Shigenobu, Y. Kasuya, *Br. J. Pharmacol.*, 98, 1360 (1989).
- 58) R.M. Rapoport, F. Murad, *Circ. Res.*, 52, 352 (1983).
- 59) R.F. Furchgott, P.D. Cherry, J.V. Zawadzki, D. Jothianandan, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 6, (suppl) s336 (1984).
- 60) L.J. Ignarro, T.M. Burke, K.S. Wood, M.S. Wallin, P.J. Kadowitz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 228, 682 (1984).
- 61) R.M.J. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada, *Nature*, 327, 524 (1987).
- 62) O.H. Lowry, N.J. Losebrogh, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).

- 63) R.J. Winqvist, E.P. Faison, S.A. Waldman, K. Schwartz, F. Murad, R.M. Rapoport, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 7661 (1984).
- 64) Y. Oyama, H. Kawasaki, Y. Hattori, M. Kanno, Eur. J. Pharmacol., 132, 75 (1986).
- 65) I. Wakabayashi, K. Hatake, N. Kimura, A. Kakishita, K. Nagai, Life Sci., 40, 643 (1987).
- 66) R.E. White, G.O. Carrier, Pharmacology, 33, 34 (1986).
- 67) K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, Br. J. Pharmacol., 97, 614 (1989).
- 68) W. Durante, A.K. Sen, F.A. Sunahara, Br. J. Pharmacol., 94, 463 (1988).
- 69) S. Meraji, L. Jayakody, M.P.J. Senaratne, A.B.R. Thomson, T. Kappagoda, Diabetes, 36, 978 (1987).
- 70) E.E. Soltis, Circ. Res., 62, 889 (1988).
- 71) S.P. Duckles, J. Pharmacol. Exp. Ther., 240, 697 (1987).
- 72) T. Abiru, K. Kamata, Y. Kasuya, J. Pharmacobio-Dyn., 14, 292 (1991).
- 73) G.M. Pieper, G.J. Gross, Am. J. Physiol., 255, H825 (1988).
- 74) T. Abiru, Y. Watanabe, K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, Res. Commu. Chem. Pathol. Pharmacol., 68, 13 (1990).
- 75) T. Abiru, K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, Can. J. Physiol. Pharmacol., 68, 882 (1990).
- 76) W.G. Mayhan, L.K. Simmons, G.M. Scharpe, Am. J. Physiol., 260, H319 (1991).
- 77) B. Tesfamariam, J.A. Jakubowski, R.A. Cohen, Am. J. Physiol., 257, H1327 (1989).
- 78) N. Miyata, K. Tsuchida, S. Okuyama, S. Otomo, K. Kamata, Y. Kasuya, Am. J. Physiol. 262, H1104 (1992).
- 79) T.F. Luscher, P.M. Vanhoutte, Hypertension, 8, 344 (1986).
- 80) N. Miyata, H. Yamaura, K. Tsuchida, S. Okuyama, S. Otomo, K. Kamata, Y. Kasuya, Can. J. Physiol. Pharmacol., 71, 297 (1993).
- 81) A.R. Christrieb, Am. J. Cardiol., 32, 592 (1983).
- 82) M. Konishi, C. Su, Hypertension, 5, 881 (1983).

- 83) Y. Shirasaki, P. Kolm, G.A. Nicholas, T.J.-F. Lee, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 53 (1988).
- 84) T.W. Shier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 195 (1979).
- 85) R.M. Rapoport, M. Ashraf, F. Murad, *Circ. Res.*, **64**, 463 (1989).
- 86) H. Rasmussen, J. Forder, I. Kojima, A. Scriabine, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **122**, 776 (1984).
- 87) T. Resink, T. Scottburden, F.R. Buhler, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **157**, 1360 (1988).
- 88) M.J. Mackay, D.W. Cheung, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **145**, 1105 (1987).
- 89) M.B. Turla, R.C. Webb, *Hypertension*, **9**, (suppl III) 150 (1987).
- 90) N.S. Cook, *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 21 (1988).
- 91) S.W. Weir, A.H. Weston, *Br. J. Pharmacol.*, **88**, 121 (1986).
- 92) N. Miyata, H. Yamaura, K. Tsuchida, S. Otomo, K. Kamata, Y. Kasuya, *Life Sci.*, **50**, 1363 (1992).
- 93) T. Inoue, Y. Ito, K. Takeda, *Br. J. Pharmacol.*, **80**, 459 (1983).
- 94) M.C. Coldwell D.R. Howlett, *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 3663 (1987).
- 95) S. Holzman, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**, 364 (1983).
- 96) K. Kamata, N. Miyata, Y. Kasuya, *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 319 (1989).
- 97) N. Miyata, K. Tsuchida, M. Tanaka, S. Otomo, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 763 (1990).
- 98) H. Schmid-Antomarchi, H. Deweille, M. Fosset, M. Lazdumski, *J. Biol. Chem.*, **262**, 15840 (1987).
- 99) D.J. Beech, T.B. Bolton, *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 851 (1989).
- 100) N. Taira, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **10**, (suppl 8) s1 (1987).
- 101) K. Tsuchida, R. Yamazaki, K. Kaneko, H. Aihara, *Arzneim. Forsch.*, **37**, 1239 (1987).
- 102) M. Muramatsu, A. Fujita-Tominaga, M. Tanaka, Y. Ishii, H. Aihara, *Jpn. J. Pharmacol.*, **48**, 453 (1988).

- 103) M. Tanaka, M. Muramatsu, H. Aihara, *Biochem. Pharmacol.*, 38, 1985 (1989).
- 104) R.J. Head, *Blood Vessels*, 26, 1 (1989).
- 105) J.E. Souness, R. Brazdil, B.K. Diocee, R. Jordan, *Br. J. Pharmacol.*, 98, 725 (1989).
- 106) R.M. Rapoport, *Circ. Res.*, 58, 407 (1986).
- 107) R. Fischmeister, H.C. Hartzel, *J. Physiol.*, 387, 453 (1987).
- 108) D.H. Maurice, R.J. Haslam, *Mol. Pharmacol.*, 37, 671 (1990).
- 109) P.J. Silver, L.T. Hamel, M.H. Perrone, R.G. Bentley, C.R. Bushover, D.B. Evans, *Eur. J. Pharmacol.*, 150, 85 (1988).
- 110) R.F. Kauffman, K.W. Schenck, B.G. Utterback, V.G. Crowe, M.L. Cohen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242, 864 (1987).
- 111) N. Miyata, K. Tsuchida, S. Otomo, *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, 176, 1552 (1991)
- 112) W. Abebe, K.M. Macleod, *Br. J. Pharmacol.*, 101, 465 (1990).

