

---

# 血管支配NO作動性神経の作用機序の解析と 病態とのかかわり

---

(課題番号 08457028)

平成8年度～9年度科学研究費補助金 基盤研究(B)(2)

研究成果報告書

平成10年3月

研究代表者 戸田 昇

(滋賀医科大学医学部教授)

## はじめに

血管支配の遠心性神経は交感神経節後繊維(アドレナリン作動性神経)であり、副交感神経(コリン作動性神経)の支配はあっても極めて少ないというのがこれまでの長年の認識であった。従って、血管径や血管抵抗の調節は交感神経支配の緊張性によると考えられてきた。しかし、我々はイヌの脳動脈が非アドレナリン性、非コリン性の拡張性神経の支配を受けていることを初めて発見し、1975年に専門誌に報告した。その後15年の間、その化学伝達物質を同定出来なかったが、1990年になって、一酸化窒素(NO)が情報伝達のメジエーターであることを示す証拠を数多く集めることが出来た。これにより、脳動脈の拡張性神経の伝達物質がNOであるとの結論を下し、この神経をNO作動性神経(nitroxidergic nerve)と命名した。その後、この神経に関する研究をさらに推進し、末梢の動脈の多くにもNO作動性神経支配が存在し、その動脈径はアドレナリン作動性収縮性神経とNO作動性拡張性神経の拮抗的二重支配を受けているとの結論に至った。

今回の研究では、NO作動性神経がヒト、サルを含む霊長類でも重要な役割を果たしているか否か、末梢神経においてNOの合成にどのような機序が関与するか、*in vivo*の系でも同神経が機能しているかどうか、循環系の病態にどのように関与するかなどについて明らかにするとともに、NO関連の治療薬発見のきっかけをつかむことを目的とした。

滋賀医科大学附属図書館



1997024244

## 研 究 組 織

研究代表者	戸田 昇	(滋賀医科大学医学部教授)
研究分担者	岡村 富夫	(滋賀医科大学医学部助教授)
研究分担者	安屋敷和秀	(滋賀医科大学医学部助手)
研究分担者	吉田 一秀	(滋賀医科大学医学部助手)

## 研 究 経 費

平成8年度	4,900千円
平成9年度	3,000千円
合 計	7,900千円

# 研 究 発 表

## 学会誌

- Hayashida, H., Okamura, T., Tomoyoshi, T. and Toda, N.:  
Neurogenic nitric oxide mediates relaxation of canine corpus cavernosum.  
*J. Urology*, **155**(3): 1122-1127, 1996.
- Toda, N. and Okamura, T.:  
Nitroxidergic nerve: regulation of vascular tone and blood flow in the brain.  
*J. Hypertension*, **14**(4): 423-434, 1996.
- Toda, N. and Okamura, T.:  
Neurogenic nitric oxide (NO) in the regulation of cerebroarterial tone.  
*J. Chem. Neuroanatomy*, **10**(3-4): 259-265, 1996.
- Okamura, T., Ayajiki, K. and Toda, N.:  
Neural mechanism of pressor action of nitric oxide synthase inhibitor in anesthetized monkeys.  
*Hypertension*, **28**(3): 341-346, 1996.
- Toda, N., Ayajiki, K. and Okamura, T.:  
Hypercapnia relaxes cerebral arteries and potentiates neurally-induced relaxation.  
*J. Cerebral Blood Flow & Metab.*, **16**(5): 1068-1074, 1996.
- Hayashida, H., Fujimoto, H., Yoshida, K., Tomoyoshi, T., Okamura, T. and Toda, N.:  
Comparison of neurogenic contraction and relaxation in canine corpus cavernosum and penile artery and vein.  
*Jpn. J. Pharmacol.*, **72**(3): 231-240, 1996.
- Toda, N., M., Toda, M., Ayajiki, K. and Okamura, T.:  
Monkey central retinal artery is innervated by nitroxidergic vasodilator nerves.  
*Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **37** (11): 2177-2184, 1996.
- Yoshida, K. and Toda, N.: Colocalization of acetylcholinesterase and vasoactive intestinal peptide (VIP) in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) positive neurons in the intralingual ganglia and perivascular nerve fibers around lingual arteries in the porcine, monkey and canine tongue.  
*Neurosci. Lett.*, **222**(3): 147-150, 1997.
- Toda, N., Ayajiki, K. and Okamura, T.:  
Inhibition of nitroxidergic nerve function by neurogenic acetylcholine in monkey cerebral arteries.

*J. Physiol.*, **498(2)**: 453-461, 1997.

Uchiyama, M., Okamura, T., Uehara, M. and Toda, N.:  
Analysis of the vasodilator nerve function by nicotine in isolated dog skin artery.  
*Eur. J. Pharmacol.*, **321(1)**: 19-25, 1997.

Toda, N., Ayajiki, K., Uchiyama, M. and Okamura T.:  
Nitric oxide-mediated neurogenic vasodilatation in isolated monkey lingual arteries.  
*Am. J. Physiol.* **272(Heart Circ. Physiol. 41)** : H1582-H1588, 1997.

Ayajiki, K., Okamura, T., and Toda, N.:  
Flunarizine, an anti-migraine agent, impairs nitroxidergic nerve function in cerebral arteries.  
*Eur. J. Pharmacol.*, **329(1)**: 49-53, 1997.

Okamura, T., Ayajiki, K. and Toda, N.:  
Hypoxia-induced inhibition of the response to nitroxidergic nerve stimulation in canine cerebral arteries.  
*J. Cerebral Blood Flow & Metab.*, **17(7)**: 807-813, 1997.

Ayajiki, K., Hayashida, H., Okamura, T. and Toda, N.:  
Pelvic nerve stimulation-induced pressor responses in corpus cavernosum of anesthetized dogs.  
*Am. J. Physiol.*, **273(Heart Circ. Physiol. 42)**: H2141-2145, 1997.

Toda, M., Okamura, T., Azuma, I. and Toda, N.:  
Modulation by neurogenic acetylcholine of nitroxidergic nerve function in porcine ciliary arteries.  
*Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* **38 (11)**: 2261-2269, 1997.

Toda, N., Ayajiki, K., and Okamura, T.:  
Effect of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitors on the neurogenic cerebroarterial relaxation.  
*Eur. J. Pharmacol.*, **340(1)**: 59-65, 1997.

## 口頭発表

安屋敷 和秀、吉田 一秀、岡村 富夫、戸田 昇：摘出イヌ伏在動脈におけるニコチンの弛緩作用機序。第89回日本薬理学会近畿部会、1996. 6.14

T. Okamura, N. Toda : Nitroxidergic innervation in primate peripheral arteries. 16th

Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 1996. 6.25

N. Toda, T. Okamura: Regulation of Retinal Arterial Tone by Nitric Oxide (NO) Derived From Endothelium and Perivascular Nerve. Satellite Symposium of XII International Congress of Eye Research, 1996. 9.28-9.29

戸田 昇、岡村 富夫、安屋敷 和秀: 一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬のサル大槽内投与による脳動脈血管径および全身血圧への影響。第19回日本高血圧学会総会, 1996.10. 3-10. 5

T. Okamura, N. Toda: Possible involvement of nitroxidergic nerve function in the regulation of blood pressure. Kobe International Symposium on NO in Cardiovascular Disease, 1996.10.18

岡村 富夫、戸田 恵美、吉田 一秀、安屋敷 和秀、戸田 昇: サル網膜中心動脈に存在する血管拡張性神経について。第90回日本薬理学会近畿部会、1996.10.25

N. Toda: Nitroxidergic nerves on cranial blood vessels. 7th International Headache Research Seminar on "Messenger Molecules in Headache Pathogenesis: Monoamines, Neuropeptides and Nitric Oxide", 1996.11.22-14

安屋敷 和秀、岡村 富夫、戸田 昇: イヌおよびサル脳底動脈におけるNO作動性神経の機能的役割。第6回循環薬理研究会、1996.12. 7

戸田 昇: 血管拡張性NO作動性神経機能の多様性について。第6回循環薬理研究会 (特別講演)、1996.12. 7

岡村 富夫、安屋敷 和秀、戸田 昇: ヒト子宮動脈における拡張性神経について。第26回日本心脈管作動物質学会、1997. 2. 1

岡村 富夫、木村 俊夫、戸田 昇: イヌ子宮および腸骨動脈における拡張性神経支配。第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-3.25

安屋敷 和秀、岡村 富夫、戸田 昇: ニホンザルにおける一酸化窒素合成酵素阻害薬の昇圧作用機序。第70回日本薬理学会年会、1997. 3.22-3.25

白石 亨、藤岡 秀行、岡村 富夫、戸田 昇: 摘出イヌ肝動脈におけるニコチン及びノルアドレナリンの弛緩機序。第91回日本薬理学会近畿部会、1997. 6.20

T. Okamura, M. Toda, K. Ayajiki, N. Toda: Neurogenic nitric oxide and acetylcholine in the regulation of monkey ciliary arterial tone. The 5th

International Meeting on the Biology of Nitric Oxide,  
1997. 9.15-9.19

K. Ayajiki, T. Okamura, H. FUjioka, N. Toda: Inhibition by hypoxia of  
nitroxidergic nerve function in canine cerebral arteries.  
The 5th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide,  
1997. 9.15-9.19

岡村 富夫、安屋敷 和秀、戸田 昇：サル脳動脈における神経性アセチルコ  
リンによるNO作動性神経機能の抑制。第20回日本高血圧学会総会、  
1997.10.30 ~ 11. 1

田中 敏樹、安屋敷 和秀、藤岡 秀行、岡村 富夫、戸田 昇：ブタ脳動脈  
における一酸化窒素(NO)作動性神経による弛緩反応とその調節。第92  
回日本薬理学会近畿部会、1997.11.14

戸田 昇：血管支配副交感神経に関する新しい考え。第71回日本薬理学会年会  
(会長講演)、1998. 3.23-3.26

## 出版物

Toda, N. and Okamura, T.: Nerve-derived nitric oxide (NO) in the regulation of  
cerebrovascular function. In: Molecular and Cellular Mechanisms of  
Cardiovascular Regulation, Edited by Endoh, M., Scholez, M.H. and Iijima, T.,  
Springer-Verlag, Tokyo, pp. 211-218, 1996

岡村富夫、戸田 昇：  
脳血管と脳血管作動物質。  
脳と循環 2 (2): 41-45 (129-133), 1997.

Toda, N.: Nitroxidergic nerve in cranial arteries. In: The Headache Pathogenesis:  
Monoamines, Neuropeptides, Purines, and Nitric Oxide. Edited by Olesen, J., and  
Edvinsson, L. pp. 241-245, 1997, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

戸田 昇, 安屋敷 和秀, 岡村富夫：  
NO 産生とカルシウム拮抗薬。  
血管と内皮 8(1): 34-39, 1998.

## 研究業績の要約

我々の研究室では、脳血管における一酸化窒素 (NO) 作動性神経の発見以来同神経の生理的役割について検討を加えてきた。その成果は最近の Review にまとめている (論文1)。今回は、脳動脈における NO 作動性神経の機能をより詳細に分析するとともに、その他の動脈と陰茎海綿体の機能調節における NO 作動性神経の関与を *in vitro* と *in vivo* の系で明らかにした。

### 1. 脳動脈と NO 作動性神経

これまでの研究で、NO を介する脳動脈の弛緩反応には細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入が必須であること、 $\text{Ca}^{2+}$  流入には N 型チャネルが関与することを薬理的拮抗薬を用いて明らかにしてきた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  は神経性 NO 合成酵素 (nNOS) を活性化して L-アルギニンからの NO の産生を促進する。この際カルモジュリンの存在が必要であることを、カルモジュリン阻害薬を用いたこれまでの研究で証明した。このたびの実験では、 $\text{Ca}^{2+}$  とカルモジュリンが nNOS の活性化にどのようなかかわりをもつかを検討するために、 $\text{Ca}^{2+}$  /カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素 II (Ca/CM - PKII) の阻害薬を用いて神経刺激反応への影響を観察した。同酵素阻害薬 KN62 と HDBA 処置は NO 作動性神経刺激による弛緩反応と組織サイクリック GMP 増加を抑制した (論文2)。このことは同酵素を介する蛋白のリン酸化が nNOS の活性化に必要であることを示唆する新しい成果である。その他の蛋白リン酸化酵素である A キナーゼ、G キナーゼおよび C キナーゼの活性化ないし不活性化をひきおこす物質の添加は、NO 作動性神経刺激の効果を変化しなかったことから、Ca/CM - PKII 以外の酵素によるリン酸化は NO 合成に関与しないと考えられる。

nNOS は血管作動性腸管ペプチド (VIP) やコリンエステラーゼと共に副交感神経細胞や同神経繊維に存在することが、組織学的検査により示されている。このことは、NO 作動性神経の機能をアセチルコリンや VIP が修飾する可能性を示唆している。サルの脳動脈条片で、NO 作動性神経刺激によって引き起こされる弛緩反応は、アセ

チルコリンのみならずエゼリン（コリンエステラーゼ阻害薬）により抑制されアトロピン処置によって増強される。NOの作用はこれらの処置により影響をうけなかったことから、コリン作動性神経より遊離されるアセチルコリンが、NO作動性神経でのNOの合成または遊離を阻害すると考えられる（論文3）。薬理的な分析によって、アセチルコリンが作用するシナプス前受容体のサブタイプはM<sub>2</sub>と結論された。一方、VIPはNO作動性神経の機能を変化しない。

その他、NO作動性神経刺激による脳動脈拡張反応は Hypoxia によって抑制されること、この作用には Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>交換系による細胞内 pH の変化が関与することを結論した（論文4）。Ca<sup>2+</sup>拮抗薬であるフルナリジンは、平滑筋だけでなく神経における Ca<sup>2+</sup>の細胞内流入を阻害することによって頭蓋内外の動脈のNO作動性神経機能を抑制することから、この作用が本薬物の偏頭痛治療効果の機序の一つである可能性を示した（論文5と6）。Hypercapnia は脳血管を強く拡張するが、その機序については知られていない。脳動脈のNO作動性神経を介する拡張反応が Hypercapnia によって増強されることが、その機序の一部である可能性を示した（論文7）。

## 2. 陰茎海綿体と NO 作動性神経

摘出イヌ陰茎海綿体標本の支配神経を電氣的に刺激すると、一過性の軽度の収縮ののち弛緩反応が観察される。 $\alpha$ -アドレナリン受容体遮断薬の処置は収縮を消失し弛緩を増大した。この弛緩反応はNO合成酵素阻害薬の処置によって消失し、アルギニン投与によって回復したことより、NO作動性神経刺激の結果と結論される。これまでこの神経性の反応に関与すると考えられていたVIPは、この動物に関する限り関係しない。海綿体にはNO合成酵素を有する神経繊維が密に分布することが、免疫組織化学的に示された（論文8）。陰茎動・静脈は海綿体に比べてアドレナリン作動性収縮反応が著しい（論文9）。サル海綿体標本でもNO作動性神経による平滑筋弛緩反応が認めらる。サルでは、この神経以外にも弛緩反応に関係する別の神経が存在するようである。

麻酔イヌの陰茎海綿体内圧は骨盤神経の電気刺激によって上昇し陰茎は Erect する。この反応はNO合成酵素阻害薬の静脈内投与に

よって消失し、L-アルギニンによって回復する。この神経刺激の効果はアトロピンや $\alpha$ -アドレナリン遮断薬の影響を受けないが、神経節遮断薬処置によって消失した。海綿体組織の近くにNO作動性神経節が存在するらしい。海綿体内に内因性NO合成酵素阻害物質を注射しても、神経性弛緩反応は消失する。インポテンスの原因の一つであるかも知れず、NO関連物質による治療の可能性も考慮に入れる必要がある（論文10）。

### 3. 末梢動脈とNO作動性神経

サルとブタの眼の毛様動脈や網膜動脈の条片標本は血管壁内神経の刺激によって、収縮ののち拡張する。薬理的、組織学的手法を用いて、弛緩反応はNO作動性神経より遊離されるNOを介してひき起こされることが証明された（論文11と12）。ブタ毛様動脈の神経性NOによる弛緩はエゼリンにより抑制され、アトロピンにより増強されることから、内因性アセチルコリンがNO作動性神経終末に作用してNOの合成ないし遊離を阻害すると思われる（論文12）。

イヌの皮膚動脈を支配している神経の刺激は、動脈収縮に続く拡張をひき起こした。収縮反応はプラゾシン（ $\alpha_1$ -アドレナリン受容体遮断薬）によって消失し、拡張反応は増大した。神経刺激による拡張は、一部NO合成酵素阻害薬によって抑制されたが完全に消失することはなかった。残った拡張反応はカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）受容体遮断薬ないしカプサイシン処置によって消失した。従って、皮膚動脈の神経刺激による拡張にはNO作動性神経に加えて、知覚神経より遊離されるCGRPが関与すると考えられる（文献13）。

サルの舌動脈標本は神経刺激に応じて収縮する。この反応はプラゾシンで軽度抑制されるに過ぎず、 $\alpha$ 、 $\beta$ -メチレンATP処置によって弛緩に逆転する。したがって、この収縮は主としてATPによる $P_{2x}$ プリン受容体の刺激によるようである。神経性弛緩反応はVIPやCCRPを介さず、NO作動性神経からのNO遊離によって引き起こされる（論文14）。サル、イヌおよびブタの舌動脈とその周辺に、NO合成酵素を含む神経細胞と神経繊維が認められ、その多くがVIPやコリンエステラーゼと共存することが明らかになった（論文15）。

この組織における VIP やアセチルコリンの機能的役割については未だよくわかっていない。

#### 4. 血圧と NO 作動性神経

麻酔ザルの静脈内に NO 合成酵素阻害薬 (N<sup>G</sup>-ニトロ-L-アルギニン、L-NA) を注射すると、持続性の血圧上昇が認められる。L-アルギニンの投与は血圧を回復する。この昇圧作用は  $\alpha$ -受容体遮断薬の影響を受けず、神経節遮断薬によって強く抑制される。このことは、L-NA による昇圧が L-アルギニンから合成される NO の産生抑制によること、その NO は主として神経に由来することを示している (論文 16)。また、NO 作動性神経が細い腸間膜動脈にも分布し、神経由来の NO を介して血管拡張をひき起こすことを明らかにした。血管抵抗減少への NO の貢献が示唆される。

以上、1966 - 1967 年に報告してきた NO 作動性神経関連の業績のうち、本研究費の支持により得られた主なものについて要約した。詳しくは添付した原著論文を参照されたい。