

---

バイオカスケード装置を用いた内皮由来  
および神経由来血管弛緩物質の測定

---

(課題番号 10670083)

平成10年度～平成11年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 **安屋敷 和秀**  
(滋賀医科大学医学部助教授)



## はじめに

血管平滑筋の緊張性は、外膜側から支配神経によって、内膜側からは血流中に存在する血管作動物質および内皮細胞由来の化学物質によって、調節されている。血管内皮細胞はプロスタノイド、エンドセリン類および一酸化窒素(NO)などを産生・遊離する。特に、NOはプロスタサイクリンとともに血管を拡張性に調節している。われわれは、内因性NOがEDRF(内皮由来弛緩因子)として働くとともに血管支配神経の拡張性神経伝達物質としても働いていることをNO合成酵素阻害薬を用いて示し、また、陰茎勃起機能を調節する海綿体支配神経の伝達物質もNOであることを報告してきた。しかし、摘出した血管や海綿体を支配する拡張性神経を電氣的に刺激して観察される弛緩が、NOによることを薬理的に証明できても、遊離されたNOを直接的に測定することは現在のところ困難である。また近年、血管抵抗を調節する細動脈において、血管内皮細胞はプロスタサイクリンやNO以外に、血管弛緩物質を産生・遊離していることが明らかとなった。同弛緩物質は、血管平滑筋細胞からのカリウム流出をひき起こし、細胞膜を過分極して血管を弛緩させると考えられ、内皮由来過分極因子(EDHF)と命名されている。しかし、このEDHFの本体は現在不明であり、循環薬理学、生理学の分野で国際的に高い注目を集めている。

そこで本研究は、血管や海綿体支配神経から遊離される微量の神経伝達物質を、高感度のバイオカスケード装置を用いて測定を試みるとともに、現在、世界的に注目を集めている本体不明のEDHFの解析を同装置を用いて行った。さらに、このカスケード装置とは別に、内皮を除去した動脈標本を用いて、産生されたEDHF様物質のバイオアッセイを行い、その薬理的解析からEDHFの本体を明らかにすることを試みた。

## 研 究 組 織

研究代表者 安屋敷和秀（滋賀医科大学医学部助教）

研究分担者 岡村 富夫（滋賀医科大学医学部教授）

## 研 究 経 費

平成10年度 1,800千円

平成11年度 1,400千円

合 計 3,200千円

## 研究成果の要約

血管内皮細胞は一酸化窒素 (NO) およびプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>) を産生・遊離し、血管の緊張性を調節している。われわれは、内因性 NO が EDRF として作用するだけでなく、血管および陰茎海綿体支配神経の拡張性伝達物質としても作用していることを報告している (論文 1)。内皮細胞は NO 以外にも内皮由来過分極因子 (EDHF) を遊離し血管を拡張するが、同物質の本体は現在も同定されていない。そこで、イヌないしサルを用い、種々の臓器から動脈および海綿体標本を摘出し、内皮に依存した弛緩および支配神経を介する弛緩反応を検討した。今回は、これまでに報告されていない内皮依存性弛緩に注目して薬理的解析を行った。さらに、バイオカスケード装置を用いて、神経由来の弛緩物質の測定と NO および PGI<sub>2</sub> 以外の内皮由来弛緩物質の測定を試みた。

下垂体後葉ホルモンであるバゾプレッシンは、その名のとおり昇圧をひき起こし、多くの血管を収縮するが、ヒトおよびイヌ脳動脈およびイヌおよびラット腎動脈ではバゾプレッシンにより弛緩することが知られている。これまで、霊長類の冠状動脈におけるバゾプレッシンの作用は報告されていなかった。そこで、日本ザルから摘出した冠状動脈を用いて、バゾプレッシンの作用を特に血管内皮の役割に注目して解析した。バゾプレッシンは、内皮正常なサル冠状動脈標本を用量依存性に弛緩した。内皮を除去した標本の張力を変化しなかった。この内皮依存性弛緩は、NO 合成酵素阻害薬である L-ニトロアルギニン (L-NA) 処置により消失し、NO の基質である L-アルギニン添加により回復した。光学異性体の D-アルギニン添加による影響は無かった。同弛緩はバゾプレッシン V<sub>1</sub> 受容体に選択的な拮抗薬処置により著しく抑制された。バゾプレッシン V<sub>2</sub> 受容体刺激薬

であるデスモプレッシンは、内皮正常な標本をわずかにしか弛緩しなかった。同弛緩もバゾプレッシン  $V_1$  受容体拮抗薬処置により消失した。以上の結果から、摘出日本ザル冠状動脈におけるバゾプレッシンの作用は、内皮に存在するバゾプレッシン  $V_1$  受容体を刺激して、NO 合成酵素を活性化し、これにより合成・遊離された NO が動脈を拡張すると考えられた。したがって、局所ないし全身性にバゾプレッシン濃度が高まった場合、正常なサル冠状動脈の内皮細胞は、NO 遊離を介して心筋虚血を保護する可能性を明らかにした（論文 2）。

NO 以外の内皮由来の血管弛緩物質が、特に抵抗血管の緊張性調節に重要な働きがあると考えられ、注目されている。現在、同物質は血管平滑筋細胞膜の  $K^+$  チャネルを開口して過分極を生じ、血管弛緩をひき起こすと考えられているが、同物質の本体は不明である。われわれは、非  $PGI_2$  非 NO 性の弛緩に注目し、各種サル摘出動脈で検討したところ、舌動脈が最大の内皮依存性弛緩を示すことを予備実験で明らかにし、NO および  $PGI_2$  以外の内皮由来弛緩物質の検討に使用した。アセチルコリンは、摘出サル舌動脈標本を内皮依存性に弛緩し、同弛緩はインドメタシン処置に影響されず、NO 合成酵素阻害薬の L-NA 処置により部分的に抑制された。L-NA 抵抗性のアセチルコリン弛緩は、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャネル阻害薬のチャリブドトキシン (CHTX) とアパミンの併用処置で消失した。同弛緩は、非選択的チトクローム P450 (CYP) 阻害薬ならびに CYP3A 選択的阻害薬、ケトコナゾールで抑制された。内皮正常なサル舌リング標本をドナー標本としてバイオカスケード装置の上流に装着し、標本の張力変化を測定するとともに、ドナー標本の直下に装着した内皮を除去したアッセイ標本の張力変化を記録した。灌流液に適用したアセチルコリンは、ドナー標本を弛緩し、この灌流液はアッセイ標本をわずかに弛緩した。この弛緩はドナー標本の L-NA 処置により消失した。

このため、L-NA 抵抗性の弛緩を同装置で測定することは困難と判断し、以下の実験を行った。CYP3A の豊富なヒト肝ミクロゾームとアラキドン酸の反応生成物は、内皮を除去した舌動脈標本を弛緩し、同弛緩は CHTX とアパミンの併用処置で消失した。ケトコナゾール存在下の反応生成物は標本を弛緩しなかった。したがって、サル舌動脈におけるアセチルコリンによる内皮依存性弛緩は、PGI<sub>2</sub> の関与はほとんどなく、NO と Ca<sup>2+</sup> 依存性 K<sup>+</sup> チャネルを開口させる CYP3A 由来のアラキドン酸代謝物によると考えられた（論文3）。

陰茎勃起は、陰茎海綿体の拡張に基づくことが知られている。われわれはイヌを用いた実験から、陰茎海綿体に分布する NO 作動性神経から遊離された NO が海綿体平滑筋を拡張し、勃起をひき起こすことを生体位および摘出標本を用いて明らかにしてきた。しかし、海綿体組織における内皮細胞の機能は十分に解析されていなかった。そこで摘出イヌ陰茎海綿体標本を用いて、界面活性物質であるサポニンを処置し、その組織学的および機能的影響を検討した。無処置の標本の内皮細胞を電子顕微鏡で観察すると、ゴルジ装置、粗面小胞体およびミトコンドリアなどの細胞内小器官が観察される。サポニン処置により、内皮細胞は変性・萎縮し、正常細胞で観察された小器官を観察することが困難となった。ただし、内皮細胞の脱落は認められなかった。機能的実験として標本の張力変化を測定した。内皮正常な海綿体標本では、アセチルコリン、ATP および Ca<sup>2+</sup> イオノフォア A23187 により弛緩した。他方、サポニンを処置した標本では、アセチルコリンおよび Ca<sup>2+</sup> イオノフォア A23187 による弛緩は消失したが、ATP による弛緩は影響されなかった。アセチルコリンによる弛緩は NO 合成酵素阻害薬の L-NA 処置により部分的に抑制され、L-アルギニン添加により回復した。L-NA 処置下に残った弛緩は、高濃度の K<sup>+</sup> ならびに非選択的な K<sup>+</sup> チャネル阻害薬であるテ

トラブチルアンモニウム処置により消失した。ATPによる弛緩はアミノフィリン処置により抑制された。経壁電気刺激を海綿体標本に適用すると、標本は頻度依存性に弛緩した。同弛緩は、L-NA処置により消失し、L-アルギニン添加により回復した。サポニンを処置した標本においても電気刺激による弛緩は無処置の標本と同程度に観察された。経壁電気刺激により支配神経から遊離される弛緩物質を、アセチルコリン刺激およびシェアストレス（ずり応力）刺激によってウサギ腸骨動脈から遊離されるNOを十分に測定できる (Ayajiki, et al. *Circ. Res.*, 78: 750-8, 1996) バイオカスケード装置を用いて測定したところ、アッセイ標本での弛緩は観察されなかった。以上の結果から、アセチルコリンは海綿体内皮からNOおよびK<sup>+</sup>チャンネル開口物質を遊離し、平滑筋を弛緩する。ATPによる弛緩は、内皮非依存性で、P<sub>1</sub>プリン受容体刺激を介する。支配神経の刺激による弛緩も内因性NOによるが、内皮機能が消失しても影響されないことを明らかにした（論文4）。

さらに、インポテンス治療薬のバイアグラ (Sildenafil) について、陰茎海綿体を支配するNO作動性神経機能に及ぼす影響とニトログリセリンなどのNO供与体とバイアグラ併用による危険性についてまとめた（論文5）。すなわち、バイアグラを代表とするホスホジエステラーゼ5型 (PDE-V) 阻害薬の投与が、勃起神経刺激の効果を増強するのは、NOが海綿体平滑筋のグアニル酸シクラーゼを活性化して産生するサイクリックGMPの分解を抑制するためである。他方、バイアグラはニトログリセリンなどのNO供与体の効果も増強するので、循環系に重大な副作用をひき起こす危険性があり、使用には十分な注意が必要であると考えられる。

本研究に使用したバイオカスケード装置は、血管内皮に由来するNOの測定には十分有用であるが、神経由来のNOを測定できなかつ

たことから、神経伝達物質としてのNOの多くは、隣接した平滑筋細胞に利用され、その作用効率は、内皮由来のNOよりもはるかに高いと考えられた。したがって、今後、神経由来のNOの測定を行うには、より大量のNOを遊離する標本をドナー標本として使用し、本装置を活用する予定である。他方、NO以外の内皮由来血管弛緩物質は、NOと比較して極めて不安定で容易に失活すると考えられた。そこで、血管内皮細胞で産生・遊離されるCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>チャンネル開口物質の解明には、バイオカスケード装置は使用せず、酵素標品を使用した再構成実験を行うことにより、研究を継続している。



## 研 究 発 表

### 学会誌等

1. 岡村 富夫、安屋敷 和秀、戸田 昇  
NO 作動性神経による血管系の機能調節  
実験医学 17: 935-940, 1999
2. Okamura, T., Ayajiki, K., Fujioka, H. and Toda, N.  
Mechanisms underlying arginine vasopressin-induced relaxation in  
monkey isolated coronary arteries.  
Journal of Hypertension 17: 673-678, 1999
3. Ayajiki, K., Okamura, T., Fujioka, H., Imaoka, S., Funae, Y.  
and Toda, N  
Involvement of CYP3A-derived arachidonic acid metabolite(s) in  
responses to endothelium-derived K<sup>+</sup> channel opening substance in  
monkey lingual artery.  
British Journal of Pharmacology 128: 802-808, 1999
4. Okamura, T., Ayajiki, K., Fujioka, H., Toda, M., Fujimiya, M.  
and Toda, N.  
Effects of endothelial impairment by saponin on the responses to  
vasodilators and nitergic nerve stimulation in isolated canine corpus  
cavernosum.  
British Journal of Pharmacology 127: 802-808, 1999
5. 岡村 富夫、安屋敷 和秀、戸田 昇  
NO とバイアグラ  
血管と内皮 特別: 50-56, 1999