

## 血管内皮依存性因子，特に一酸化窒素と高血圧

砂野 哲,<sup>\*,a,b</sup> 関口富美子<sup>a</sup>**Endothelium-Derived Factors in Hypertensive Blood Vessels,  
Especially Nitric Oxide and Hypertension**Satoru SUNANO<sup>\*,a,b</sup> and Fumiko SEKIGUCHI<sup>a</sup>*School of Pharmaceutical Sciences<sup>a</sup> and Pharmaceutical Research and Technology Institute,<sup>b</sup>  
Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka 577-8502, Japan*

(Received February 27, 2003)

Endothelium-dependent relaxation (EDR) in the blood vessels of spontaneously hypertensive rats (SHR) and the role of nitric oxide (NO) in the initiation of hypertension are reviewed. EDR was impaired in blood vessels of SHR depending on age and degree of hypertension when compared with those of normotensive rats. The cause of the impairment varied among the type of blood vessels: a decrease in the production of NO and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) and an increase in the production of endothelium-derived contracting factor (EDCF) are the main causes of the impairment in large arteries, while a decrease in endothelium-dependent hyperpolarization and increased release of EDCF are the main causes of the impairment in small arteries. Interactions among these endothelium-derived factors and changes in the interactions are also causes of impairment. Superoxide may be involved in the impairment of EDR by destroying NO. The endothelium depresses smooth muscle contraction, including spontaneous tone developed in vascular smooth muscle, and the depressing effect of the endothelium is impaired in the preparations from SHR. The endothelium of blood vessels of SHR are structurally injured as demonstrated by scanning electron microscopy. Antihypertensive treatment prevented these functional and structural changes. Chronic treatment with inhibitors of NO production in normotensive rats impaired EDR and elevated blood pressure. The impairment of EDR is a secondary change due to continued hypertension, and early initiation of antihypertensive therapy is recommended.

**Key words**—endothelium-dependent relaxation; nitric oxide; hypertension; spontaneously hypertensive rats; therapy

## はじめに

血管内皮が内皮依存性弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor, EDRF) を遊離して血管平滑筋を弛緩させていることは 1980 年, Furchgott and Zawadzki<sup>1)</sup> によって発表されて以来, 急速に研究が進み, 弛緩因子が一酸化窒素 (NO) であり, 平滑筋の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内サイクリック GMP を増量させ弛緩させることも明らかとなった。<sup>2-6)</sup> その後の研究で弛緩因子としてプロスタグランジン I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) なども内皮から遊離され, 弛緩活性を持っていることが明らかとされたが, 一般に弛緩因子と言えば NO を意味する。

血管内皮はこの弛緩因子の他に収縮因子や過分極

因子を遊離することが明らかとなってきた。収縮因子としてはエンドセリンやアラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ経路の代謝産物 (トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) あるいはプロスタグランジン H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) が考えられている) がある。過分極因子については異論があるところで, 本体は不明のままである。

高血圧患者あるいは高血圧動物の血管ではこの内皮依存性弛緩の障害があり, 刺激薬などによる血管平滑筋の収縮が亢進していることが知られている。<sup>7-15)</sup> この内皮依存性弛緩の障害の機序としては, 1) 内皮由来弛緩因子の遊離減少, 2) 内皮由来収縮因子の遊離増加, 3) 内皮由来過分極因子の遊離減少などが考えられる。いずれにしても, 内皮依存性弛緩の障害は血管抵抗の増加につながり, 血圧上昇の原因となり得る。実際に, 内皮依存性弛緩の障害を高血圧の原因とする考えもあるが, 少なくとも血圧上

<sup>a)</sup> 近畿大学薬学部, <sup>b)</sup> 近畿大学薬学総合研究所 (〒577-8502 東大阪市小若江 3-4-1)

\*本総説は, 平成 14 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

昇の一因となり得ることは確かである。ここでは、血管内皮と高血圧について考えてみたい。

### 1. 内皮依存性弛緩と高血圧

高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats, SHR) や脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (stroke-prone SHR, SHRSP) あるいは悪性脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (malignant SHRSP, M-SHRSP) などの血管では内皮依存性弛緩の障害があることが大動脈 (Fig. 1),<sup>16-42)</sup> 大腿動脈,<sup>43)</sup> 腸間膜動脈,<sup>36,43-66)</sup> 腸骨動脈,<sup>32)</sup> 頸動脈,<sup>32,43,67,68)</sup> 脳動脈,<sup>40,69-73)</sup> 腎動脈,<sup>43,63,74-77)</sup> 冠動脈,<sup>47,77,78)</sup> 筋細動脈<sup>79)</sup>などで報告されている。

われわれは血圧の異なる諸系統の高血圧自然発症ラットを用いて血圧と内皮依存性弛緩の障害との関係を検討した。Figure 2は正常血圧のWistar Kyoto rats (WKY), SHR, SHRSP, M-SHRSPの大動脈を用いて血圧と内皮依存性弛緩を検討したものであるが、ラットの血圧が高くなるに従って内皮依存性弛緩の障害が強くなり、血圧と障害の程度との間にはほぼ直線関係があることを示している。なお、この内皮依存性弛緩の障害はラットの週齢依存性で、加齢ラットで高度になり、血圧が高いラットの血管でこの加齢による影響も急速になることも確認された。<sup>16)</sup> 大動脈における加齢による内皮依存性弛緩の障害と高血圧による障害の加速はKoga *et al.*<sup>31)</sup>に

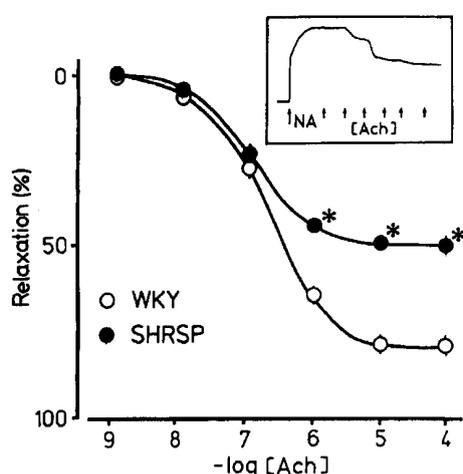


Fig. 1. Concentration-Response Curves of Acetylcholine for Endothelium-Dependent Relaxation of Aortae from Wistar Kyoto Rats (WKY) and Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats (SHRSP)

The aorta was precontracted by  $5 \times 10^{-7}$ M noradrenaline (NA), and acetylcholine (ACh) was applied cumulatively after the contraction achieved its maximum: significant difference from respective value of preparations from WKY (\*:  $p < 0.05$ , reproduced from Ref. 21).

よっても観察されている。同様の加齢による内皮依存性弛緩の障害はわれわれ以外にも報告されていて、大動脈では幼若あるいは成熟 SHR では障害がみられず老齢 SHR で障害されているという報告<sup>34)</sup> や頸動脈<sup>43,68)</sup> や腸間膜動脈,<sup>28,34,43,80)</sup> 大腿動脈<sup>43)</sup>でも加齢によって障害の程度が大きくなるという報告があって、やはり WKY に比べて SHR の標本でこの傾向が高度になっているとされている。高血圧発症前、あるいは発症中の幼若 SHR の血管では内皮依存性弛緩の障害がみられない<sup>56,81)</sup> あるいは同様の幼若 SHRSP 大動脈では内皮依存性弛緩の亢進がみられる<sup>82)</sup> という報告もあり、この点からみると高血圧の発症に内皮の弛緩機能の障害が関与しているということは疑問である。

高血圧自然発症ラットの血管でも弛緩薬、前収縮薬によって反応が異なるという報告もある。例えば、Li and Bukoski<sup>60)</sup> は腸間膜動脈でノルアドレナリンで前収縮させた場合は弛緩の障害がみられるが、バゾプレッシンで前収縮させた場合は障害がみられないと報告しているし、Wirth *et al.*<sup>34)</sup> はブラジキニンによる弛緩は障害されているが、アセチルコリンによる弛緩は障害されていないと報告している。一方、Sim and Chua<sup>83)</sup> は大動脈でアセチルコリンによる弛緩は障害されていなかったと報告しているし、Koga *et al.*<sup>38)</sup> も同様の報告をしている。腎動脈でもアセチルコリンに対する反応に差がみられなかったという報告もある。<sup>84)</sup> また、SHR の大動脈ではアセチルコリンによる弛緩がむしろ亢進していたという報告もある。<sup>23)</sup> このように多少異なる報告があるものの、高血圧自然発症ラットの血管では高血圧と週齢によって影響される内皮依存性弛緩の障害があるという点で多くの報告が一致していると言える。

後で述べるように、この高血圧自然発症ラット大動脈における内皮依存性弛緩の障害は長期降圧剤治療で阻止、回復させることができることも、血圧と内皮機能の障害が高血圧の結果起きたことを示唆する。<sup>21,24,64,85)</sup> さらに高血圧自然発症ラットにおいても血圧の低い肺動脈では内皮依存性弛緩の障害がみられないこともこの結論を支持する。<sup>86)</sup>

血圧に最も強く影響するのは抵抗血管である小動脈である。前述したように、この小動脈である腸間膜動脈でも内皮依存性弛緩の障害があることが報告

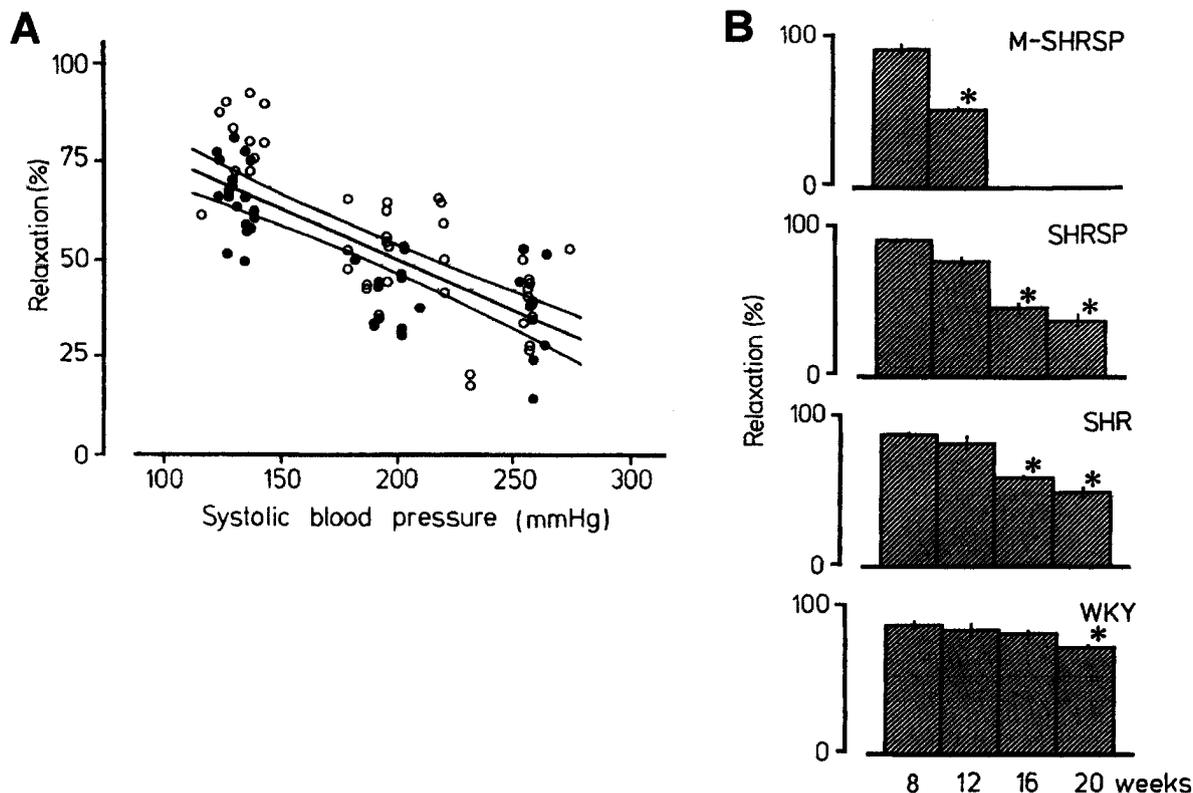


Fig. 2. A: Blood pressure and degree of endothelium-dependent relaxation of aortae of various strain of spontaneously hypertensive rats. B: Age-dependent change in endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine.

A: The preparations were precontracted by  $5 \times 10^{-7}$ M noradrenaline and, at the peak of contraction, acetylcholine of  $10^{-5}$ M was applied to induce endothelium-dependent relaxation. B: M-SHRSP, SHRSP, SHR and WKY indicate malignant stroke-prone spontaneously hypertensive rats, stroke-prone spontaneously hypertensive rats, spontaneously hypertensive rats and normotensive Wistar Kyoto rats, respectively. Blood pressure of rats were higher in this order. Note the difference in the speed of the decrease of the relaxation: significant difference from the value at 8 weeks of age (modified from Ref. 16).

されているが、弛緩に関与する因子が大血管の場合とは多少異なっている。このことに関しては後で述べることにする。

高血圧自然発症ラット以外の高血圧動物を用いた研究でも、これらの動物の血管で内皮依存性弛緩の障害があることが報告されている。例えば、DOCA 高血圧ラットの大動脈<sup>87,88</sup>や腸間膜動脈,<sup>89</sup> Dahl 食塩高血圧ラット大動脈,<sup>90</sup> 腎性高血圧ラットの大動脈<sup>87,88,91,92</sup>や腸間膜動脈,<sup>93</sup> 絞扼高血圧ラットの大動脈,<sup>94</sup> 絞扼高血圧ウサギの胸部大動脈や頸動脈,<sup>95</sup> ニュージーランド遺伝性高血圧ラット大動脈<sup>96</sup>などで内皮依存性弛緩の障害があることが報告されている。また、DOCA 高血圧ラットの大動脈ではアセチルコリンによる弛緩が変化していないという報告<sup>97</sup>があり、この標本では平滑筋の弛緩反応が障害されているので、内皮由来の弛緩因子の遊離は増加しているという結論になっている。

われわれの SHRSP の肺動脈を用いた実験では内

皮依存性弛緩の障害がみられなかった。<sup>86,98</sup> SHRSP でも肺動脈圧は高くないので、高血圧が内皮依存性弛緩の障害の原因であるという考えを支持する結果である。絞扼高血圧ラット<sup>94</sup>あるいは絞扼高血圧ウサギ<sup>95</sup>でも絞扼部位以下の血管（血圧が高くない）では内皮機能の障害がみられないことも血圧と内皮機能の障害との間に何らかの関係があることを示唆する。しかし、最近 SHR の腸間膜動脈では内皮依存性弛緩の障害があるが、ニュージーランド遺伝性高血圧ラットの大動脈ではみられないという報告<sup>94</sup>があるし、高血圧自然発症ラットでも腎動脈では内皮依存性弛緩が障害されていない<sup>99,100</sup>あるいはアセチルコリンによる弛緩は障害されていないがブラジキニンによる弛緩は障害されているという報告<sup>94</sup>や幼若 SHR の大動脈でもブラジキニンによる弛緩は早くから障害されているという報告、正常食 SHRSP の腎動脈や腸間膜動脈では内皮依存性弛緩の障害は起こりにくいが、食塩負荷 SHRSP の腸間

膜動脈では障害が著明であったという報告<sup>101)</sup>などもあって、高血圧と内皮機能の異常との因果関係も単純ではないかもしれない。

このように、多少異なる報告があるものの、高血圧の動物では血管の内皮依存性弛緩の障害があり、それは高血圧の程度と関係がある。つまり、そこになんらかの因果関係があるとする報告がほとんどである。他方、加齢によっても内皮依存性弛緩の障害がみられ、SHRでも幼若の血管では内皮機能の障害がみられないという報告も多いし、正常血圧ラットでも老齢動物の血管では障害があるがその程度は軽度である。これらのことから、高血圧とその持続期間が障害の決定因子である可能性が高いことは確かである。なお、これらの報告の多くは血管平滑筋のニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応には高血圧による変化がないか、あるいは逆に亢進しているということを確かめており、弛緩の障害は内皮機能の障害によるものであると言える。

## 2. 高血圧ラットの血管における内皮依存性弛緩の障害の内容

**2-1. NOの遊離減少** 血管内皮におけるNOはNO合成酵素(NOS)と呼ばれる酵素の働きでL-アルギニンからL-シトルリンができるときに発生する。<sup>102,103)</sup> L-アルギニンのニトロ化合物の多くはこの合成過程を阻害する。<sup>104-106)</sup> ラット大動脈の内皮依存性の弛緩はこれらの化合物によってほぼ完全に阻害されることは、この弛緩が内皮由来のNOによるものであることを示唆する。<sup>18,26,28,32,107)</sup> したがって、高血圧自然発症ラットの大動脈における内皮依存性弛緩の障害は内皮からのNO遊離の減少による可能性が強い。しかし、後で述べるように、SHRの内皮依存性弛緩の障害は内皮由来の収縮因子の影響を除いておいた条件下ではみられず、NOの遊離にも変化がないとする論文もみられる。

特に小動脈では内皮依存性弛緩の障害がNOの遊離減少以外の機序によってもたらされるとする報告が多い。<sup>20,44-46,49,89,98,108,109)</sup> われわれはSHRSP腸間膜動脈において、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩の障害があるが、アパミンとカリブドトキシンを用いて平滑筋の内皮依存性過分極を阻止した実験から、これは過分極の減弱によるもので、NO遊離減少以外の機序によってもたらされる可能性が強いことを報告した。<sup>45)</sup> その後のわれわれの実験で

も、腸間膜動脈の内皮依存性弛緩の障害がNOの遊離減少によるものではないという結果が得られている。<sup>98)</sup> 同様の結果はOnaka *et al.*<sup>57)</sup> の高Kを用いて過分極を阻止した実験においても得られている。同様にAdeagbo *et al.*<sup>110)</sup> もN<sup>ω</sup>-ニトロ-L-アルギニン(L-NAME)の効果から、NOS活性にはWKY, SHR腸間膜動脈間で差がないと結論している。しかし、この結果はMantelli *et al.*<sup>80)</sup> が同じ腸間膜動脈で幼若WKYのアセチルコリン弛緩は主としてK<sup>+</sup>チャンネルの活性化(過分極因子による)によるものであるが、幼若SHR, 加齢SHR及び加齢WKYのアセチルコリン弛緩は主としてNOによるもので、NO遊離の差がWKY, SHR標本間の差になると言っているものとは一致しない。また、SHRの脳血管ではL-アルギニンによる弛緩やL-NAMEの効果が大きくなっていて誘導型NOS(iNOS)の関与がWKYの同じ血管より大きくなっているという報告もある。<sup>111)</sup>

実際に高血圧自然発症ラットの血管ではNO遊離の減少があるのだろうか? 灌流腎臓を用いた実験ではSHRの標本において、アセチルコリンによる血管拡張は低下していたが、NO遊離にはWKY腎臓との間に差がみられなかったと報告されている。<sup>112)</sup> WKY腎血管のアセチルコリンによる拡張が細胞外K<sup>+</sup>濃度を上昇させることで減少して、この環境下ではSHR, WKY間の差がなくなることから、血管拡張の差は主として内皮由来過分極因子遊離の差によるものであるとした。しかし、同じグループが翌年に、SHRSPの腎血管ではNOのbasic release, acetylcholine-stimulated releaseともに著明に減少しているという結果を報告しているし、<sup>113)</sup> DOCA高血圧ラットでもアセチルコリンで遊離されるNOが減少していることを報告している。<sup>114)</sup> SHRSPでは高血圧の程度も高く、内皮の損傷や内皮依存性弛緩の障害が高いことからNO遊離も減少していると考えられるが、SHRで減少が全くみられなかったかどうかは疑問である。培養したSHRSPの内皮細胞ではNO遊離の減少があったという報告があるし、<sup>115)</sup> さらに、高血圧ラットではNOSの欠損があつてこれが高血圧の原因であると結論している論文もみられる。<sup>116)</sup>

体内NOレベルでは、Sawada *et al.*<sup>117)</sup> が血清nitriteを測定して、basal, acetylcholine-stimulatedと

もに SHR, WKY 間で差がみられなかったと報告しているし, Hong *et al.*<sup>118)</sup> は血中 NO レベルは SHR の方が高いことを観察してこれは iNOS が増加した結果であると報告している。

このように, 報告によって差があるものの NO 遊離には SHR, WKY 間の差がみられないという報告が多い。しかし, 血管のサイズによって NO 遊離が異なる可能性もある。上記の論文において測定された NO が太い血管からのものであるか, 細い血管からのものであるかは不明である。

後で述べるように, ノルアドレナリンは血管平滑筋を収縮させるが, 同時に内皮由来弛緩因子 (NO) を遊離させて収縮を抑制する。これは内皮の  $\alpha_2$  受容体刺激によるもので, 血管は  $\alpha_2$  受容体刺激薬によって弛緩する。SHRSP の大動脈ではこの弛緩も著明に障害されている。<sup>119,120)</sup> 高血圧動物の血管における内皮依存性弛緩の障害に内皮の  $M_3$  受容体の異常が関与している可能性もあるが,<sup>65,121)</sup> 前述のブラジキニンを始め  $\alpha_2$  受容体などの刺激による内皮依存性弛緩も障害されていることは高血圧自然発症ラットの血管における弛緩因子の遊離減少が, 血管の受容体の特定の変化によるものではなく, 弛緩因子生成, あるいは生成された弛緩因子の遊離減少によるものであることを示唆する。

**2-2. 内皮由来収縮因子** 血管における内皮依存性弛緩の障害は, 同時に遊離される内皮由来収縮因子の遊離増加によっても起こり得る。高血圧動物の血管において内皮依存性弛緩を障害している内皮由来の収縮因子としては, まず  $TXA_2$  や  $PGH_2$  が考えられているが, これらはアラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼ経路の代謝産物であることは先に述べた。この経路の代謝はインドメタシンで遮断することができるが, 高血圧自然発症ラットの大動脈における内皮依存性弛緩の障害はインドメタシン処理によって改善され, 正常血圧ラットの血管並みの弛緩反応がみられるようになる。<sup>30,31,35,38,122-124)</sup> また, SHR 大動脈では前収縮させない内皮正常標本にアセチルコリンを作用させた場合にも収縮反応がみられ, この収縮は内皮除去あるいはインドメタシン処理で遮断される。WKY の大動脈ではこのような内皮依存性収縮反応はみられない。<sup>123)</sup> 同様の報告は Ito *et al.*<sup>124)</sup> によってもなされていて, SHR 大動脈でみられた L-NAME 存在下でのアセチルコ

リン収縮は ONO-3708 によって遮断されたことから, このときの内皮由来収縮因子は  $PGH_2$  であるとした。同様に, 高血圧自然発症ラット大動脈における弛緩の障害が  $TXA_2/PG$  エンドパーオキシドのアンタゴニスト処理で消失することから, 内皮依存性弛緩を障害している収縮因子は  $TXA_2$  あるいは  $PGH_2$  であるとされた。<sup>39)</sup> その後の PG-synthase の実験結果から, この血管においても  $PGH_2$  が最も可能性が高いとされている。<sup>125)</sup>

前述したように, SHR 大動脈ではアセチルコリンによって内皮依存性収縮の収縮がみられ,<sup>28,123)</sup> この収縮はラットの週齢, 高血圧依存性である。<sup>28)</sup> 同様に, DOCA 高血圧ラットの大動脈でも内皮依存性の自発性収縮がみられるという報告があるが,<sup>126)</sup> これは平滑筋の自発性収縮で内皮がそれを抑えていたのであるとも考えられる。事実, 後で述べるように, 高血圧ラットの血管平滑筋には高血圧依存性の自発性収縮がある。

高血圧自然発症ラット血管における内皮依存性弛緩のインドメタシンあるいはメクロフェナム酸による増強は腸間膜動脈<sup>44-46,49,51,58,61,62,98)</sup> や腎動脈<sup>2,75,77)</sup> でもみられているが, 脳底動脈ではインドメタシンは減少した弛緩を改善させなかったと報告されている。<sup>71)</sup> しかし, 同じ著者が脳小動脈で, SHR では内皮依存性弛緩の障害があり, この障害に  $PGH_2/TXA_2$  受容体が関与していると報告していること<sup>70)</sup> とは矛盾する。高血圧ラットの血管における内皮依存性弛緩がインドメタシンによって改善されることは DOCA 高血圧ラットの腸間膜動脈でも報告されている。<sup>89)</sup>

小動脈では高血圧による内皮機能の障害が強く, アセチルコリン高濃度投与では逆に収縮してくる傾向があるので, 後で述べる内皮依存性収縮が亢進している可能性が強い。他方, ウサギ絞扼高血圧ラットの大動脈では内皮依存性弛緩の障害があるが, インドメタシン処理では改善されなかったという報告があり, 他の高血圧との内皮機能障害の機序が異なっている可能性が示唆される。

いずれにしても, アラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼの代謝産物が内皮由来の収縮因子であることが知られ,<sup>28,123,127)</sup> SHR の血管の内皮依存性弛緩の障害がインドメタシンで改善されるという報告が多いことは, 高血圧ラットの血管では, 内

皮由来の収縮因子の遊離増加があり、内皮依存性の弛緩を障害している可能性を示すものである。その収縮因子は  $\text{TXA}_2$  と  $\text{PGH}_2$ 、あるいは  $\text{TXA}_2$  又は  $\text{PGH}_2$  であるとされているが、<sup>31,61,75,77,108,128,129</sup> そのなかで  $\text{PGH}_2$  である可能性が最も高い。<sup>28,30,70,126,130,131</sup>

われわれの腸間膜動脈における検討でも高濃度のアセチルコリン投与では SHRSP の血管で内皮依存性が反転して収縮傾向を示すようになってくるが、この傾向はインドメタシン存在下で消失することから、この反応が収縮因子によって起きていると考えられた (Fig. 3).<sup>44,45,98</sup> ただ、この実験で各因子は他の因子との間に相互作用があり、単純に考えることもできないことも明らかとなった。しかし、SHRSP の大動脈を用いたわれわれの実験<sup>26</sup>) ではアセチルコリンあるいは  $\alpha_2$  刺激薬による弛緩はインドメタシンに大きく影響されることがなく、障害された弛緩が WKY の標本なみに回復することもなかった。このことは同じ NO 遊離を起こす受容体刺激でも受容体の種類によって収縮因子遊離を起こさないものがある可能性を示す。また、SHRSP の血管では内皮の  $\alpha_2$  受容体刺激による弛緩も障害されているが、この障害は収縮因子遊離増加によるものではないと考えることもできる。さらに、収縮因子の関与は血管の部位によっても異なっている可能性もあることが示唆される。

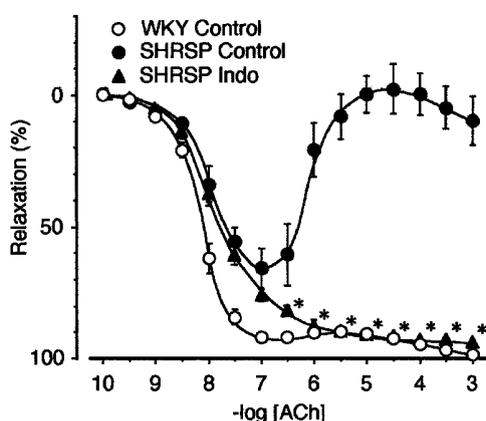


Fig. 3. Effect of Indomethacin on Endothelium-Dependent Relaxation of Mesenteric Arteries from WKY and SHRSP

Indomethacin was applied for the purpose of blocking the influence of endothelium-derived contracting factor (EDCF) in this case. Preparations were precontracted in the presence of  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  of noradrenaline, and acetylcholine was applied cumulatively in the absence and presence of indomethacin as indicated in the figure. Note the effect of indomethacin in the preparation from SHRSP. Indomethacin exhibited negligible effect in the preparation from WKY (modified from Ref. 44).

内皮由来の収縮因子の1つとしてエンドセリンがあるが、このことについては次項で述べる。

**2-3. エンドセリン** 内皮由来の血管収縮因子の1つにエンドセリンがある。内皮作用薬によって NO 遊離が起こる際、同時にエンドセリン遊離がある場合にも内皮依存性弛緩の障害になるが、SHRSP の腸間膜動脈を用いたわれわれの実験では、エンドセリンによる弛緩の障害は WKY の標本に比べてむしろ減少しているという結果が得られた。<sup>45</sup> 同じ腸間膜動脈で平滑筋のエンドセリンに対する反応が変わっていないか、あるいは亢進しているという報告があるので、<sup>132</sup> 内皮からのエンドセリン遊離はむしろ減少している可能性が高い。このことは、SHR ではエンドセリンの組織レベルは変化していないか、むしろ低下しているという報告<sup>133</sup>)とも一致する。

一方、エンドセリンの高血圧への関与に関する報告も多く、<sup>134-139</sup> 血管レベルでの実験結果とは必ずしも一致しない。先に述べたように、高血圧動物の血管平滑筋ではエンドセリンに対する感受性あるいは反応性が亢進していることが報告されているので、<sup>132,140-142</sup> この矛盾はそのことで説明できるのかも知れない。

いずれにしても、高血圧動物の血管における内皮依存性弛緩の障害が内皮からのエンドセリン遊離増加による可能性は低い。

**2-4. 内皮由来過分極因子** 内皮由来の過分極因子については存在についても見解の一致をみないが、血管平滑筋の弛緩をもたらす膜の過分極が内皮依存性であり、small conductance  $\text{K}^+$  チャンネルを抑制するアパミンと large conductance  $\text{K}^+$  チャンネルを抑制するカリブドトキシンで抑制されることは確かである。<sup>143</sup> 高血圧ラットの腸間膜動脈平滑筋ではこの内皮依存性過分極が小さくなっている (障害されている) ことが知られている。<sup>53,57,144,145</sup> Fujii *et al.*<sup>145</sup>) によるとこの過分極の低下は age-dependent で WKY でもみられるが、SHR の標本では加齢とともに急速に低下すると報告されている。このことは先に述べた内皮依存性弛緩の場合と一致して、高血圧の程度と持続期間が1つの決定因子となっていることを示唆する。また、この過分極の減少は SHR を降圧薬の種類を問わず降圧治療することによって回復させることができるという報告<sup>57</sup>)も

内皮依存性過分極の低下がこのラット特有のものではなく、高血圧の持続がもたらしたものであるという考えを支持する。さらに、高血圧ラットの血管平滑筋における内皮依存性過分極の低下は腎性高血圧ラットの大動脈でも報告されているので、<sup>91)</sup> 高血圧自然発症ラット特有の変化ではないと言える。

これらの差が内皮依存性過分極因子の遊離減少によるものであるか、血管平滑筋側の性質の差によるものであるかは現在不明である。また、血管平滑筋の過分極が内皮から電気緊張的に伝導されたものであるとの報告もあるので、<sup>143,146)</sup> 高血圧ラットの血管では内皮細胞のアセチルコリンによる過分極自体が減弱している可能性もある。<sup>147)</sup>

内皮依存性過分極の低下はわれわれの内皮依存性弛緩に関する最近の実験でもみられていて、アセチ

ルコリンによる弛緩のうち apamin と charybdotoxin によって遮断される部分が SHRSP の腸管膜動脈では減少していることが確かめられている (Fig. 4).<sup>45,98)</sup> 上述したように、小血管平滑筋の膜の過分極が平滑筋の弛緩に十分貢献するとも考えられているので、血管、特に細い血管の内皮依存性弛緩の障害は、過分極因子の遊離減少ではなく、この過分極の障害によるものも含まれていると言える。しかし、この平滑筋の過分極の障害が何に起因するかは今後の検討が待たれる。

この他にも、同じ腸管膜動脈でもアセチルコリンによる過分極には SHR の標本と WKY の標本間で差がみられなかったという報告や、<sup>101)</sup> SHR の標本の  $\sigma_2$  受容体刺激による過分極には NO が関与していて、これが障害されているという報告などがあ

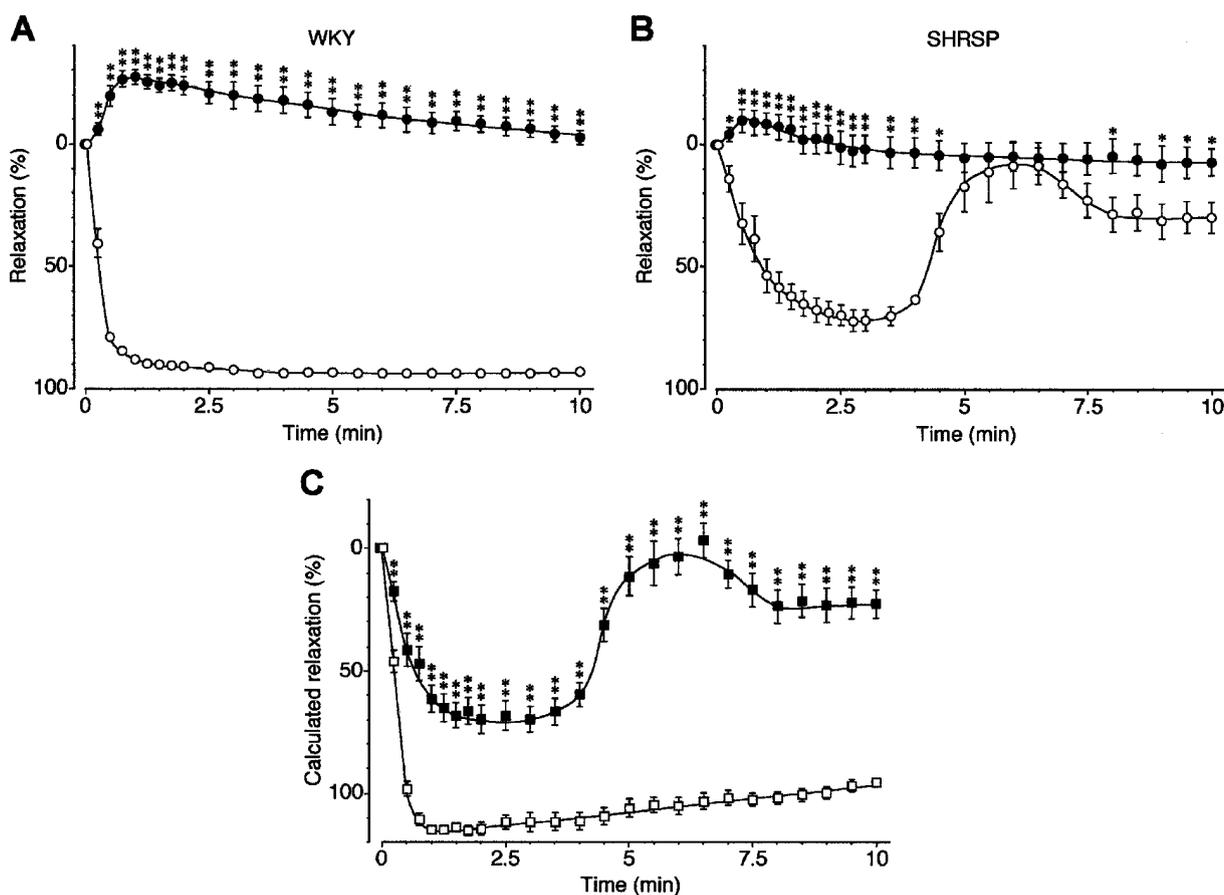


Fig. 4. Endothelium-Dependent Relaxation in the Absence of Endothelium-Derived Nitric Oxide (EDNO) and Endothelium-Derived Contracting Factor (EDCF)

The experiments were performed in the presence of  $N^G$ -nitro-L-arginine (L-NOARG) and indomethacin. In A and B, the acetylcholine-induced relaxation in the presence of these agents (open circles) was completely blocked by a combination of apamin ( $5 \times 10^{-6}M$ ) and charybdotoxin ( $10^{-7}M$ ) (closed circles), which has been known to block the endothelium-dependent hyperpolarization (EDH). In C, pure effect of EDH was expressed as the effect of the combination of apamin and charybdotoxin obtained from the difference of two curves in A and B. These figures indicate that the relaxation induced by acetylcholine in the absence of EDNO and EDCF is due to EDH in both preparations and that the relaxation induced by pure EDH is impaired in the preparation from SHRSP (close squares) when compared to that from WKY (open squares) (reproduced from Ref. 217).

り、今後の精細な研究が必要とされる。

**2-5. 内皮由来の因子間の相互作用** 血管内皮は上記した因子を同時に遊離するが、最近われわれは、これら因子の遊離あるいは作用に因子間で相互作用があるのではないかと考え、腸間膜動脈を用いて検討した。<sup>44,98)</sup> 実験はそれぞれの因子の遊離あるいは作用を遮断して、単独の因子の作用を検討する、あるいはその組み合わせによって、1つの因子と他の特定の因子との相互作用を検討するというものである。その結果、腸間膜動脈においてはこれら各因子の間に相互作用があり、正常条件下での反応はその結果であることが示され、SHRSPの標本と正常血圧のWKYの標本ではその相互作用にも差があることが明らかとなった。なお、この研究では少なくとも腸間膜動脈の内皮依存性弛緩のほとんどが内皮由来の過分極因子によってもたらされるものであり、この弛緩にSHRSP, WKY両標本間の差がみられることも示された。

各因子間の相互作用は他の血管でもみられていて、SHRの大動脈において Auch-Schwelk *et al.*<sup>148)</sup> は内皮由来の収縮因子とNOの間の、Ito *et al.*<sup>63)</sup> はPGH<sub>2</sub>とNOの間の相互作用を報告している。

いずれにしても、内皮由来の各因子間には相互作用がある可能性があり、各因子の遊離あるいはその因子の作用の強弱を検討する場合は他の因子の影響を除外しておく必要がある。

**2-6. 高血圧と内皮の構造** SHRの大動脈の内皮では内皮の構造変化があり、内皮が不規則になっている。<sup>14)</sup> SHRの脳血管でも同様の構造変化が報告されているし、<sup>149)</sup> われわれのSHRSPの大動脈を用いた実験では内皮細胞が不規則な配列を示す他に、所々に剥離がみられ、一見して機能低下を伺わせる像が観察された。<sup>21)</sup> 腸間膜動脈ではこの変化がさらに著明になり、内皮の剥離が高度になり、正常血圧のWKY腸間膜動脈でみられたような一層の平らな内皮細胞を敷き詰めたような構造は全くみられなかった (Fig. 5).<sup>20,53)</sup> 同様にSHRの大動脈でも形態的に障害された細胞の数が増加していたと報告されている。<sup>150)</sup> このように、血管の部位を問わず、高血圧自然発症ラットの血管内皮は形態学的に損傷されていると言える。

血管内皮における形態的变化は高血圧自然発症ラット以外にも観察されていて、<sup>151)</sup> 絞扼高血圧ある

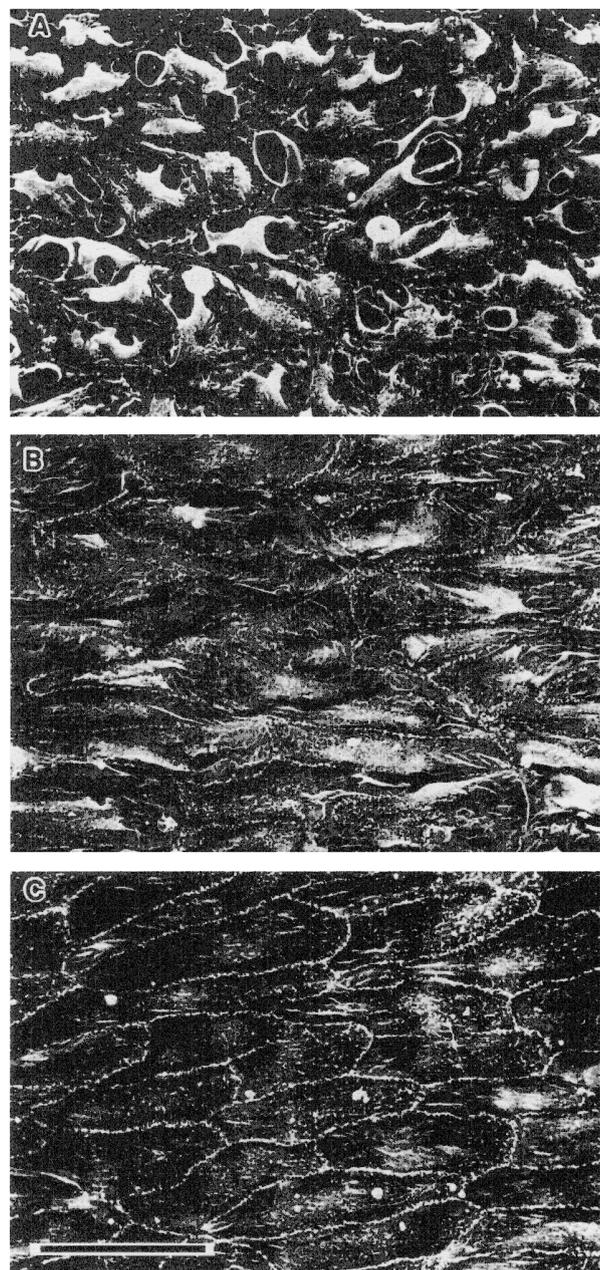


Fig. 5. Scanning Electron-Micrograph of the Endothelium of Mesenteric Arteries from SHRSP (A), Chronically Carvedilol-Treated SHRSP (B) and WKY (C)

The blood pressure of SHRSP, carvedilol-treated SHRSP and WKY was 246 mmHg, 199 mmHg and 135 mmHg (mean of 21 to 28 rats), respectively. Note the change in the surface of the endothelium in the preparation from SHRSP and the recovery by antihypertensive treatment (reproduced from Ref. 53).

いはDOCA食塩高血圧ラットの大動脈内皮細胞の肥大 gap junctionの異常がみられたと報告されている。<sup>151)</sup> 細部では高血圧の種類によって多少異なるものの、高血圧ラットでは一般に血管内皮の形態的变化が起きていると言える。しかし、この形態異常がどのように機能異常につながるかは現在不明で

ある。

### 3. 血管平滑筋の収縮と内皮(高血圧による変化)

内皮から遊離される各因子は血管平滑筋の収縮性の刺激によっても遊離されるので、平滑筋の収縮に種々の影響を与える。なかでも、弛緩因子が血管平滑筋の収縮反応を抑制することはよく知られ、多くの収縮反応は内皮除去、内皮依存性弛緩因子遮断薬(NOS阻害薬)あるいはサイクリックGMP産生阻害薬などの存在下で増強される。<sup>152,153)</sup>したがって、収縮の抑制は内皮から遊離されるNOによるものであると言える。内皮のNO遊離には持続性のNO遊離と、血管平滑筋を収縮させる薬物が内皮細胞も刺激して遊離させる2つがある。

大動脈のノルアドレナリン収縮の内皮による抑制は主として内皮の $\alpha_2$ 受容体刺激によって遊離されるNO弛緩によることが示されているが、<sup>154)</sup>SHRSPの血管ではこの遊離も障害されていることも明らかにされた。<sup>119,120)</sup>しかし、 $\alpha_1$ 刺激薬であるフェニレフリンによる収縮も内皮由来のNOによって抑制されるので、内皮の $\alpha_1$ 受容体刺激によってもNOの遊離が起こる可能性がある。SHRSPの血管ではこの抑制も減弱している(Fig. 6)<sup>155)</sup>。

また、ノルアドレナリンを繰返し投与した場合は次第に収縮作用が減弱してくる。この減弱は内皮依存性で内皮除去標本ではみられないし、加齢ラットの血管ではこの現象が弱くなっている。高血圧自然

発症ラットの大動脈ではこの現象がさらに減弱しているし、加齢による減弱も著明になっている。<sup>156)</sup>このことは内皮依存性弛緩に対する高血圧と加齢の効果と類似していて、内皮の機能の障害によるものと考えられる。

内皮由来のNOによる収縮の抑制はノルアドレナリン収縮以外にもセロトニン収縮でもみられ、やはりSHRSPの標本で抑制が弱くなっている。<sup>25)</sup>しかし、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> やK<sup>+</sup>収縮では内皮による抑制はほとんどなく、したがってSHRSPとWKY間の差もみられない。内皮によるセロトニン収縮の抑制は頸動脈でもみられているが、この抑制にはSHR、WKY間で著明な差がみられていない。<sup>99)</sup>しかし、N <sup>$\omega$</sup> -ニトロ-L-アルギニン(L-NNA)によるK<sup>+</sup>収縮の増強はWKYの標本において著明であったという報告もあるが、<sup>157)</sup>この場合も内皮の緊張性NO遊離を考えれば説明されよう。

大動脈の平滑筋には通常、自発性収縮はない。高血圧自然発症ラットの大動脈平滑筋には自発性筋緊張があり、刺激がない状態でも張力発生がみられる。この自発性収縮は高血圧の程度が高くなると大きくなる。内皮は緊張性にNOを遊離していてこの収縮を著明に抑制している。われわれの実験では、L-NNAで内皮由来のNOの産生を遮断すると収縮反応がみられ、この反応はラットの血圧が高いほど大きくなっていることが明らかとなった。<sup>7,158-160)</sup>

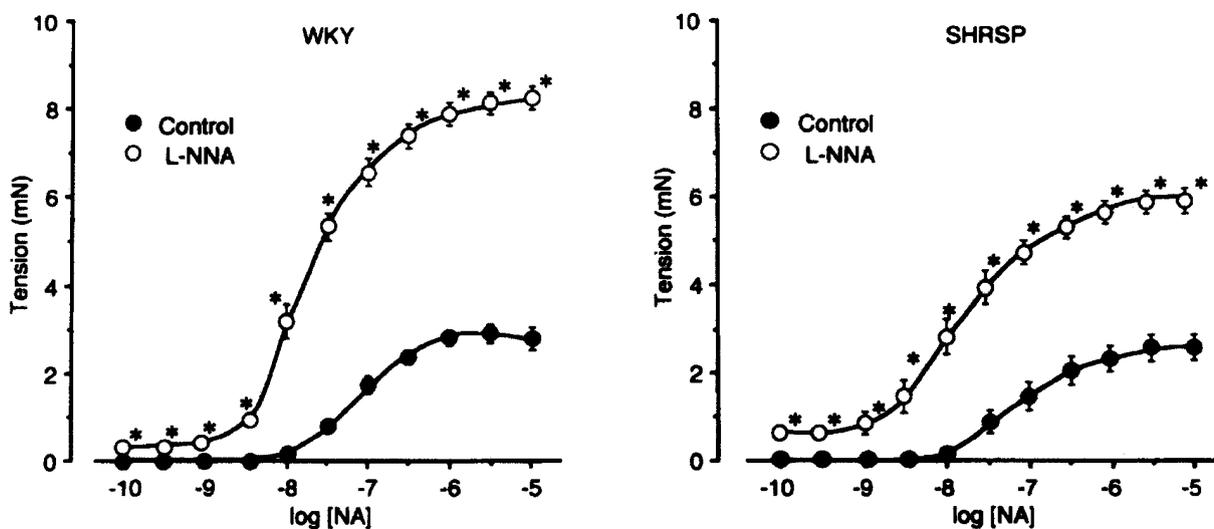


Fig. 6. Concentration-Response Curves for Noradrenaline-Induced Contraction in the Preparations with Intact the Endothelium in the Absence and Presence of N <sup>$\omega$</sup> -Nitro-L-Arginine (L-NNA)

Note that L-NNA enhanced the contraction in both preparations and that the enhancement was impaired in the preparations from SHRSP (reproduced from Ref.155).

この反応は高血圧自然発症ラット血管平滑筋の自発性収縮によってもたらされるものであるが、極端な高血圧を示す M-SHRSP の大動脈では平滑筋の自発性収縮の亢進と内皮の抑制機能の減弱があつて、この平滑筋の異常収縮を完全に抑制しきれず、内皮正常標本においても弱い自発性収縮がみられた (Fig. 7).<sup>158)</sup>

内皮除去あるいは NOS 阻害薬による自発性収縮の発現は DOCA 高血圧ラットや絞扼高血圧、アンジオテンシン高血圧などでもみられているが、<sup>126,161)</sup> これも血管平滑筋の自発性収縮によるもので、内皮の緊張性 NO 遊離がこれを抑えていると考えられるし、Yamazaki *et al.*<sup>162)</sup> の  $\text{N}^G$ -モノメチル-L-アルギニン (L-NMMA) による血圧の上昇が SHR で著明であつたという報告も血管平滑筋の興奮—収縮の変化で説明されよう。

このように、高血圧自然発症ラットの血管では平滑筋の収縮性の亢進と内皮の抑制機能の低下があり、血管収縮が亢進した状態となっている。このことは血圧の上昇をさらに促進することになる可能性がある。

#### 4. 高血圧血管内皮と活性酸素

内皮由来の弛緩因子を遊離させるような刺激は、同時に内皮細胞内の活性酸素の合成を促す。発生した活性酸素は NO を不活性化して弛緩活性を消失させる。<sup>163–165)</sup> したがって、活性酸素の発生を阻害するか、発生した活性酸素を酵素を用いて分解して

しまうと血管の弛緩反応が促進される。<sup>166)</sup> この場合、活性酸素ディスムターゼ (SOD) は無効であるという報告も多いが、細胞膜を通過する SOD 類似薬を用いると内皮依存性弛緩が促進されるという報告もある。<sup>167)</sup> この活性酸素の産生には内皮細胞でキサンチンオキシダーゼが関与している。したがって、内皮依存性弛緩はキサンチンオキシダーゼを阻害することによって促進される。<sup>168,169)</sup>

高血圧血管における内皮依存性弛緩の障害は、内皮における活性酸素合成の亢進によるものとする報告がある。<sup>170)</sup> この報告によると、高血圧動物の血管における内皮依存性弛緩の障害は SOD 処理することによって改善されたと言う。われわれも最近、SHRSP の大動脈における内皮依存性弛緩の障害は SOD によって部分的ではあるが有意に改善されることをみている (Sekiguchi *et al.*, 未発表)。このことから、この血管においては障害の一部に活性酸素による NO の不活性化が関与している可能性があると考えている。しかし、内皮依存性弛緩が内皮由来の収縮因子、あるいは内皮依存性過分極の減弱によってもたらされる他の血管においてはあてはまらない。

ヘパリン結合 SOD やキサンチンオキシダーゼ阻害薬処理により SHR の血圧は低下するが、WKY の血圧は低下しないという報告も高血圧の成因にキサンチンオキシダーゼ活性で産生される活性酸素が関与している可能性を示す。<sup>171)</sup>

このように高血圧自然発症ラットの血管では、活性酸素産生異常が内皮で産生される NO を不活性化して血管平滑筋の弛緩を障害している可能性が示された。しかし、高血圧動物の血管あるいはその周囲の活性酸素の増量があるかどうかに関して不明であるので、結論的なことは言えない。

#### 5. 内皮の NO 合成酵素遺伝子 (eNOS Gene)

高血圧の血管内皮では eNOS gene の欠陥があるという結果が動物<sup>116)</sup> やヒト<sup>172–174)</sup> で報告されている。逆に、eNOS ノックアウトマウスにアデノウイルスから得た eNOS gene を移植すると血管の障害されていた NO 依存性弛緩が回復することが報告されているが、<sup>175)</sup> 同様の回復は SHR<sup>176)</sup> やアンジオテンシン高血圧ラットに eNOS gene を移植した場合にもみられると報告されている。<sup>177)</sup> さらに、SHR に naked eNOS plasmid DNA を注入すると長

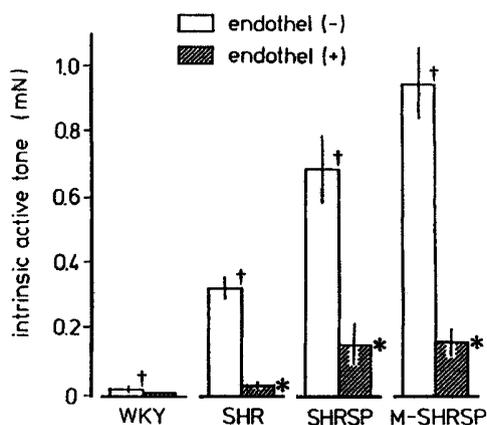


Fig. 7. Spontaneous Tone of Endothelium-Intact and -Removed Aortae of Rats with Different Blood Pressure

Endothel (+) and endothel (-) indicate endothelium-intact and removed preparations, respectively. The tone was sensitive to extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and was measured by removing  $\text{Ca}^{2+}$  from incubation medium (Tyrode's solution). Note that the endothelium depressed the tone (reproduced from Ref. 26).

期の降圧が観察され、同時に NO 産生も増加していたという報告もなされている。<sup>178)</sup>

DOCA 食塩高血圧ラットでこの処理が血管の活性酸素を減らすことが報告されているので、<sup>179)</sup> 上記の高血圧の原因に活性酸素による NO の不活化が関与している可能性もある。

## 6. 治療効果

**6-1. 内皮依存性弛緩** 高血圧動物の大動脈における内皮依存性弛緩の障害は、動物を長期降圧治療することによって防ぐことができる、<sup>19,20,22,24,27,31,35,67,130)</sup> あるいは回復させることができる (Fig. 8).<sup>21)</sup> 同様の結果は腸間膜動脈においても得られている。<sup>53,64,85,180)</sup>

これらの結果は SHRSP の血管における内皮依存性弛緩の障害が高血圧持続の結果起きた二次的変化である可能性を示唆する。事実、血管を絞扼して上流を高血圧にした血管でも内皮依存性弛緩の障害がみられるし、絞扼部位以下では内皮依存性弛緩の障害はみられない。<sup>94)</sup> また腎動脈を絞扼して高血圧にしたラットの絞扼を解除すると、障害されていた内皮依存性弛緩も徐々に回復する。<sup>91)</sup> また、この障害

が降圧薬の種類によらず血圧が低下するということがも高血圧が障害の原因である可能性を示す。

高血圧動物の内皮依存性弛緩の障害の回復は、高血圧動物をアンジオテンシン変換酵素阻害薬で治療した場合のみみられ、他の降圧薬で治療した場合は血圧の下降が同程度であってもみられないという報告もある。<sup>27,64)</sup> 確かに、われわれの実験でもアンジオテンシン変換酵素阻害薬で治療した場合には回復が著明であるという結果が得られている。<sup>21)</sup> その後の研究で Clozel<sup>131)</sup> はアンジオテンシン変換酵素阻害薬治療は収縮因子の増加を抑えるのではなく、減少した NO 遊離を回復させるとした。大動脈ではホスファチジルコリンリポソーム治療でも内皮依存性弛緩障害の改善がみられ、この障害が内皮細胞膜の欠陥によるものであると考えられている。<sup>37)</sup> しかし、TXA<sub>2</sub>/PG エンドパーオキシド受容体拮抗薬で治療した場合は内皮機能の改善はみられるが、このとき血圧の下降はみられなかったことから、この障害が高血圧の原因であるという考えに疑問を抱く論文もみられる。<sup>39)</sup>

SHR の腸間膜動脈を用いた Onaka *et al.*<sup>57)</sup> の報告ではエナラプリル投与とヒドララジン、ヒドロクロロチアジドの組み合わせ投与で降圧治療した場合、いずれも内皮依存性弛緩の改善がみられるが、前者の方が効果が著明で、WKY の標本より大きな弛緩がみられたという結果が得られている。この標本では、インドメタシンと L-NNA 存在下でも弛緩がみられ、この条件下でもエナラプリル治療の効果が著明であることは、この治療によって NO 以外の因子 (過分極因子) の遊離増加が起こることを意味する。腸間膜動脈では他にもカルシウム拮抗薬あるいはアンジオテンシン II 拮抗薬、血管拡張薬いずれの降圧治療によっても内皮機能の改善がみられることが報告されている。<sup>85)</sup> 腎動脈では内皮依存性弛緩に NO による部分と過分極因子による部分があるが、このうち NO による部分はカルシウム拮抗薬によって改善されるが、血管拡張薬エカラジンは無効であったと報告されている。<sup>70)</sup>

いずれにしても、ヒドララジン治療でも十分な用量で長期に治療した場合には高度の回復がみられるし、<sup>21)</sup> カルシウム拮抗薬やその他の治療薬で治療した場合の回復も報告されている。<sup>57)</sup>

これらの結果は、これらの薬物固有の内皮機能改

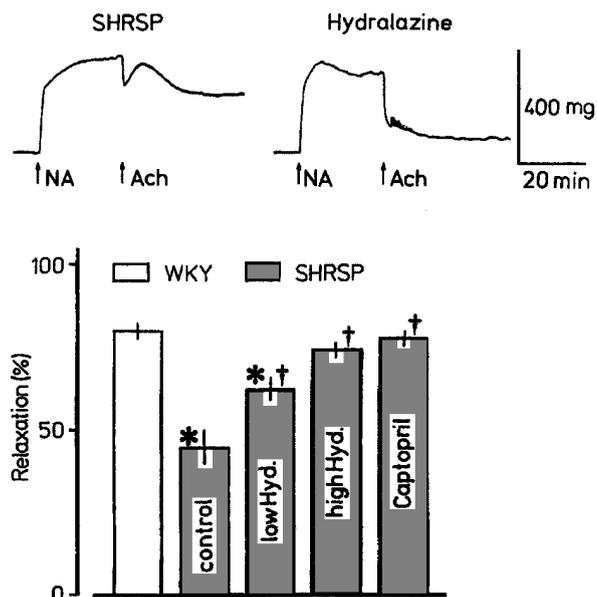


Fig. 8. Effect of Antihypertensive Treatment of SHRSP on Endothelium-Dependent Relaxation in SHRSP Aorta

The treatments were started at the age of 6 weeks and high dose (high Hyd) was adjusted to lower the blood pressure close to that of WKY. The blood pressure of WKY, SHRSP treated with high Hyd and captopril at the age of 16 weeks was 132 mmHg, 131 mmHg and 155 mmHg, respectively. The relaxation was induced with  $10^{-5}$ M acetylcholine in  $5 \times 10^{-7}$ M acetylcholine-precontracted aorta. Note that treatment with captopril recovered the relaxation to the level of WKY aorta (reproduced from Ref. 21).

善効果ではなく、一般的な降圧作用の結果である可能性を示唆しているが、アンジオテンシン変換酵素阻害薬の効果が著明である、あるいは他の降圧薬は無効であるという報告は、内皮依存性弛緩の障害にアンジオテンシンが何らかの役割を果たしている可能性も残している。

アンジオテンシン変換酵素阻害薬治療は SHR の腎血管における NO 遊離の減少を改善するという報告がある。<sup>113)</sup> この実験では DOCA 食塩負荷ラットではこの治療によって血圧降下もなく、NO 遊離減少の改善もみられなかったことから、SHR における NO 遊離の改善は血圧降下が原因であると言っている。この考えはわれわれの内皮依存性弛緩の障害は高血圧持続の結果起きた内皮障害によるものであるという考えを支持するものである。Dahl 食塩感受性ラットに食塩を負荷して高血圧にしたラットの動脈では内皮依存性弛緩の障害があるが、<sup>181)</sup> 降圧治療によって回復させることができたと言われている。<sup>90)</sup> 降圧薬による差なのか、動物による差なのかは不明であるが、高血圧が内皮機能障害の原因であるという考えには矛盾しない。

内皮依存性過分極に対する降圧治療の効果についての報告もある。<sup>57)</sup> この報告によるとアセチルコリンにより障害されている SHR 腸間膜動脈平滑筋の内皮依存性過分極はエナラプリルあるいはヒドララジン、ヒドロクロロチアジドの組み合わせのいずれで降圧治療することによっても改善させることができることをみている。また、インドメタシンと L-NNA 存在下でのアセチルコリンに対する弛緩反応(内皮依存性過分極による)もこれらの降圧治療によって改善されることもみている。ただ、この場合はエナラプリル治療の効果が強力で、対照 WHY 標本における弛緩より強力な弛緩反応がみられたが、このことは良く説明されていない。なお、この報告では SHR 腸間膜動脈でも平滑筋の過分極を阻害した条件下での弛緩(NOによる弛緩)の障害がなく、降圧治療の効果もみられなかったと述べている。

また、SOD あるいはキサンチンオキシダーゼ阻害薬長期治療が高血圧を改善するという報告もみられるが、<sup>171)</sup> このときにみられる内皮依存性弛緩の改善が血圧改善の結果なのか、もともと高血圧動物では活性酸素の増加があり、これが改善されたため

の内皮依存性弛緩の改善なのかは不明である。

いずれにしても、高血圧の初期からの長期治療は内皮依存性弛緩の改善につながり、このことは血圧をさらに降下させる可能性が高いことを示唆する。ただ、降圧薬の中でもアンジオテンシン変換酵素阻害薬あるいはアンジオテンシン II 拮抗薬がより有効であったという報告が多く、高血圧における内皮機能の障害にアンジオテンシン系が関与している可能性が強い。培養内皮細胞の NO 遊離は環境圧を上げると低下するが、この低下は AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬で回復させることができたという最近の報告は、<sup>182)</sup> NO 遊離あるいはその障害に内皮細胞レベルでレニン-アンジオテンシン系が関与している可能性を示唆するものである。この点でこの系の降圧薬治療の有効性は注目されよう。

**6-2. 内皮の構造変化に対する治療効果** 高血圧ラットの動脈内皮の構造変化はラットを降圧治療することによって予防される。われわれの実験では、SHRSP を降圧薬投与で WKY 並の血圧で飼育することによって内皮の構造変化を防ぐことができた。<sup>19,21)</sup> この実験では降圧薬としてヒドララジンとカプトプリルを用いたが、両者の効果に著明な差異はみられなかった。同様に SHRSP の腸間膜動脈における内皮の構造変化もカルヴェジロールで降圧治療することによって防止することができ、この治療で高血圧の発症を予防した SHRSP の腸間膜動脈の内皮は WKY の同じ血管内皮と同様に整然とした細胞配列がみられた (Fig. 4)。<sup>20,53)</sup> このように、高血圧ラットの血管における内皮の構造変化は降圧薬の如何にかかわらずすべて降圧治療することで予防できるという結果が得られた。大腿動脈でもジヒドリピリジン系のカルシウム拮抗薬で降圧治療することによっても損傷を軽減することができたと報告されている。<sup>151)</sup> SHR 大腿動脈においても内皮の形態変化はシラザプリル治療することによって完全に正常化することができたと報告されている。<sup>27)</sup>

このように、血管内皮損傷に対する降圧効果はいずれの降圧薬を用いても血圧降下があればみられ、高血圧の持続が内皮に形態的損傷をもたらしたとも考えられる。

## 7. NOS 阻害薬長期投与による高血圧

NOS 阻害が血管の内皮依存性弛緩を阻害し収縮反応を亢進させることが明らかとなったが、NOS



Fig. 9. Effect of Continuous Infusion of  $N^{\omega}$ -Nitro-L-Arginine (L-NNA) on Blood Pressure of WKY

L-NNA was infused from femoral artery (reproduced from Ref. 11).

阻害薬を生体に投与した場合はどうなるであろうか？ この問題は極めて初期から検討され、L-NMMAあるいはL-NAMEなどを血管内投与した場合に血圧の上昇がみられることが知られていた (Fig. 9).<sup>162,183-187)</sup> 正常血圧動物に NOS 阻害薬を経口投与した場合にも血圧の上昇がみられる。この場合は持続的投与が必要で、投与を中止した場合は上昇した血圧はまもなく正常に戻る。しかし、D-NMMAを投与した場合は血圧の上昇はみられない。<sup>184,186)</sup> また、NOS 阻害薬による血圧の上昇はL-アルギニン投与で防ぐことができるが、D-アルギニンは無効である。<sup>184)</sup>

血圧の急上昇がみられない濃度の NOS 阻害薬を経口で慢性的に投与した場合は血圧の緩やかな上昇がみられ、数日後には高血圧ラット並みの血圧を示すようになる。<sup>188-204)</sup> この場合も投薬中止による血圧の回復は緩やかで、投薬前の値に戻るのに約 48 時間を要するという報告<sup>204)</sup>や half-life が 4.2 日<sup>188)</sup>であったという報告がある。この NOS 阻害薬慢性投与による血圧の上昇もL-アルギニンの急性投与によって部分的にはあるが、回復させることができたが、<sup>199,201)</sup> D-アルギニンは無効であったと報告されている。<sup>199)</sup>

SHRSP ではL-NMMAによる血圧の上昇が著明になっているという報告がある。<sup>162,205)</sup> また、同じ NOS 阻害薬での高血圧発生過程の SHR では WKY との間に血圧上昇は見かけ上、差がみられないが、高血圧が完成した週齢の WKY と比べて大きくなっているという報告がある。<sup>162)</sup> L-NAME を用いたわれわれの実験でも SHR で WKY に比べて著明な血圧の上昇をみているが、SHRSP あるいは M-SHRSP では逆に血圧上昇の程度が低下しているという結果が得られている。<sup>185)</sup> われわれは、これらのラットでは血圧が極端に高くなっているため、更なる血圧の上昇が起らないことによると考えている。

いずれにしても、正常血管では NO の緊張性

(持続的) の遊離があり、血圧の上昇を抑えているが、この NOS の阻害はこの NO 遊離の遮断となり血圧が上昇すると考えるのが一般的である。<sup>195,206)</sup> Rees *et al.*<sup>206)</sup> は Sabra ラットを用いて、L-NMMA によって高血圧になるラットはこの薬物によって NO が減少するし、高血圧にならないラットは NO 産生の増加があるために NO 減少が少ないという結果を得ていることもこの考えを支持する。

これらの阻害薬によって起こる血圧の上昇のすべてが血管内皮の NOS 阻害によるものであるという考えには異論もある。例えば、イヌではL-NNA 血管内投与による血圧の上昇はヘキサメソニウムで遮断されることから、神経に対する効果が介在すると言われているし、<sup>187)</sup> ラットでも NOS 阻害薬の慢性投与による高血圧に交感神経<sup>196)</sup>や腎神経<sup>200)</sup>が関与しているという報告もある。事実、これらの NOS 阻害薬の慢性投与は中枢交感神経活動を亢進させるという報告もみられる。<sup>207,208)</sup> しかし、ヒトでみられる NOS 阻害薬による血圧の上昇に中枢交感神経系が関与していることを支持しないというデータも報告されている。<sup>209)</sup>

NOS 阻害薬の長期投与で高血圧になったラットの血管を摘出して内皮依存性弛緩の障害をみたという報告がある。<sup>32,193)</sup> L-NAME 慢性投与で高血圧にした Wistar ラットを用いたわれわれの実験<sup>32)</sup>では大動脈、頸動脈、腸骨動脈いずれでもアセチルコリンによる内皮依存性弛緩の障害がみられたし (Fig. 10)、同様の結果は Henrion *et al.*<sup>202)</sup> によっても報告されている。WKY の大動脈を用いた実験ではL-NAME を慢性投与したラットの大動脈ではアセチルコリンによる内皮依存性弛緩の障害があるが、腸間膜動脈では障害はみられなかったと報告されている。<sup>192)</sup> これらの実験に用いた灌流液には NOS 阻害薬は含まれておらず、この障害が細胞外に残存する NOS 阻害薬によってもたらされたものとは考えにくい。長期に投与された NOS 阻害薬は細胞内に貯留して NO 合成を阻害しているのであろう。前述の投与中止による血圧の回復に時間を要した結果もこれによって説明されよう。あるいは、NOS 阻害によって発症した高血圧が内皮機能障害を引き起こしたと考えることもできる。後述する NOS 阻害薬慢性投与による高血圧と血管内皮依存性弛緩の障害が降圧薬治療で改善されたという結果はこの考えを

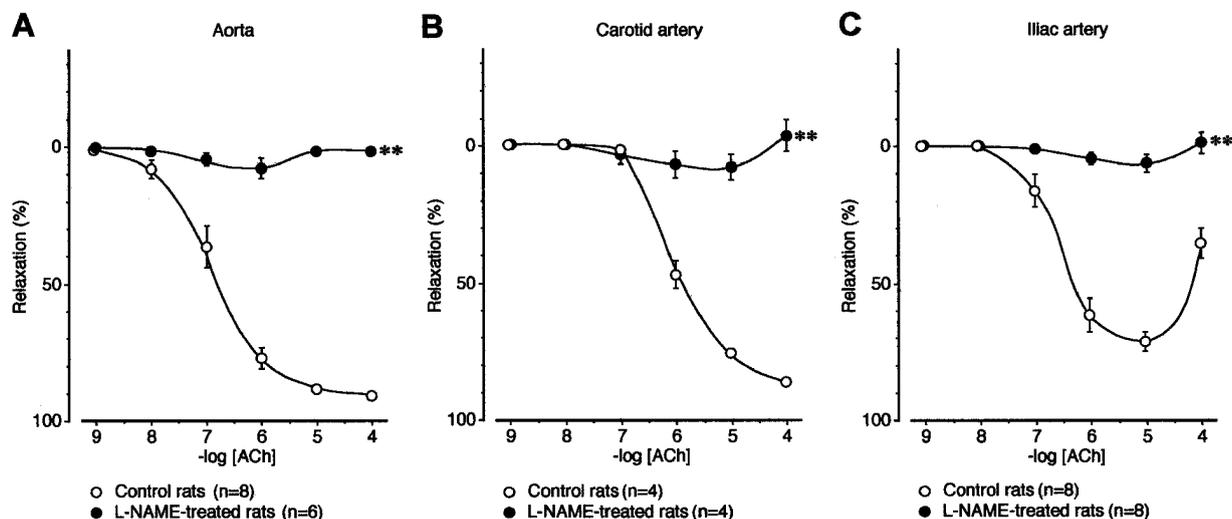


Fig. 10. Effect of Chronic Treatment with  $N^{\omega}$ -Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) on Endothelium-Dependent Relaxation in Aorta, Carotid Artery and Iliac Artery from Wistar Rats

The blood pressure of the rats was elevated from 137 to 197 mmHg by this treatment. Note that endothelium-dependent relaxation of all preparations was almost completely abolished by this treatment (modified from Ref. 32).

支持する。いずれにしても、これらの結果は NO 合成阻害 (NO 遊離減少) が血圧の上昇の原因になっている可能性を示すものでもある。

NOS 阻害薬投与ラット大動脈,<sup>32)</sup> 腸骨動脈,<sup>32)</sup> 腸間膜動脈<sup>193)</sup>などを用いた実験ではニトロプルシドナトリウムに対する弛緩反応は低下していないことが確認されているので、NOS 阻害薬慢性投与による内皮依存性弛緩の障害はサイクリック GMP 産生能を含めた血管平滑筋の反応異常によるものではなく、内皮の NO 産生の減少によるものと考えられる。同様の結果は摘出腎における実験でも得られていて、<sup>189)</sup>やはり NOS 阻害薬慢性投与で高血圧になったラットの腎臓ではアセチルコリンによる灌流圧の低下が減少している。このとき、ニトロプルシドナトリウムに対する反応はむしろ亢進しているという結果が得られているので、血管平滑筋ではなく内皮の NO 遊離の減少によるものとされている。ただ、血圧に最も関係が深いと考えられる抵抗血管である腸間膜動脈において内皮依存性弛緩の障害がみられなかったという報告は、<sup>192)</sup>この慢性投与による血圧の上昇が単純に内皮の NO 合成阻害によるものではなく、他の因子も関与している可能性を示唆するものである。

また、高血圧自然発症ラットの場合と同様に、ベラパミルあるいはトランドラプリルなどの降圧薬の同時投与で NOS 阻害薬による血圧の上昇を抑えた

場合は、血管の内皮依存性弛緩の障害がみられなくなるという報告がある。<sup>109)</sup>この結果は内皮依存性弛緩の障害が NOS 阻害薬による高血圧の結果起きたものであることを示唆する。しかし、肺動脈では NOS 阻害薬長期投与によっても動脈圧の著明な上昇がないが内皮依存性弛緩は著明に障害されている。<sup>98)</sup>それでは、血圧上昇の原因は何であるかということになるが、この点についてはいまだ解決されていない。

## 8. ヒト本態性高血圧と内皮

ヒトでのこの研究は前腕での血流量変化、末梢血管抵抗、血圧変化などを測定したもので、摘出血管を用いて内皮依存性弛緩を検討した報告はみられないと言える。まず、本態性高血圧患者でアセチルコリン血管内投与による前腕動脈の血管拡張が正常血圧者に比して減弱しているという報告がある。<sup>210-212)</sup>この場合、ニトロプルシドナトリウムによる血管拡張は正常患者との間に差がみられない。<sup>210-212)</sup>高血圧患者における内皮依存性血管拡張は患者をカプトプリルで降圧治療することによって改善することができるという報告<sup>211)</sup>と降圧効果があつたいかなる薬物によっても改善しないという報告<sup>212)</sup>があつて一致しない。後者ではヒト本態性高血圧患者の血管内皮機能の障害は、いったん始まると非可逆的で元に戻ることはないというものである。このような報告があるので、ヒトにおいては内

皮依存性弛緩の障害が本態性高血圧の一因であるか、高血圧持続の結果であるかは不明のままである。

アセチルコリンによる血管拡張の低下は高血圧患者のみならず、家族歴に高血圧患者を持つ家族においてもみられると報告されている。<sup>213)</sup> この場合もニトロプルシドナトリウムに対する反応は変化していない。このことは、本態性高血圧患者における内皮依存性弛緩の障害は高血圧の結果ではなく、むしろ高血圧発症の原因となり得ることを示唆するものである。本態性高血圧患者における血管拡張の障害は冠動脈の血管造影でもみられていて、アセチルコリンによる血管拡張が正常血圧者の冠動脈に比して減弱していたと報告されている。<sup>214)</sup>

一方、本態性高血圧患者でもカルバコールによる前腕の血管拡張は変化していないという報告もある。<sup>215)</sup> この実験でも、ニトロプルシドナトリウムによる血管拡張も変化していないことが確認されているので、内皮機能の変化はないと言える。

いずれにしても、健常者にL-NMMAを投与すれば血圧の上昇がみられるので、<sup>216)</sup> ヒトの場合もNOが血圧の調節（下降）に役割を果たしていることは間違いないが、その機序（内皮性か神経性）は確定されていない。

#### おわりに

以上、高血圧と血管内皮機能について述べたが、高血圧動物の血管では内皮機能の障害、特に弛緩因子と過分極因子の遊離減少と収縮因子の遊離増加があり、このいずれも高血圧の原因になり得ることが示された。特に、内皮由来の弛緩因子、なかでもNOの遊離減少は高血圧をもたらすことも示唆された。しかし、これらの異常が高血圧の原因なのか、あるいは持続する高血圧の結果なのかについては更なる検討が必要とされる。いずれにしても、高血圧を治療して正常血圧に戻すことは内皮機能の改善につながり、さらに血圧を下げるか上昇を抑えるという報告が多く、この意味からの降圧治療の効果というものも考慮されてよい。

#### REFERENCES

- 1) Furchgott R. F., Zawadzki J. V., *Nature*, **288**, 373-376 (1980).
- 2) Rapoport R. M., Drznin M. B., Murad F., *Nature*, **306**, 174-176 (1983).

- 3) Förstermann U., Mülsch A., Böhme E., Busse R., *Circ. Res.*, **58**, 531-538 (1986).
- 4) Ignarro L. J., Harbison G. G., Wood K. S., Kadowitz P. J., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **237**, 893-900 (1986).
- 5) Mülsch A., Böhme E., Busse R., *Eur. J. Pharmacol.*, **135**, 247-250 (1987).
- 6) Ignarro L. J., *Circ. Res.*, **65**, 1-21 (1989).
- 7) Sunano S., Sekiguchi F., Shimamura K., *Biomed. Res.*, **11**, 137-147 (2000).
- 8) Sunano S., *Kekkan Naihi*, **2**, 359-367 (1992).
- 9) Sunano S., *Junkan Seigyō*, **10**, 595-605 (1989).
- 10) Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **28**, 241-243 (1992).
- 11) Sunano S., *Igaku no Ayumi*, **170**, 454-457 (1994).
- 12) Sunano S., Sekiguchi F., "Hypertension and Endothelium of Blood Vessels," Medical Tribune, Tokyo, 1997, pp. 1-7.
- 13) Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., "Vasodilatation, Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium," ed. by Vanhoutte P. M., Raven Press, New York, 1988.
- 14) Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., "Relaxing and Contracting Factors. Biological and Clinical Research," ed. by Vanhoutte P. M., Humana Press, Clifton, NJ, 1988, pp. 495-509.
- 15) Winquist R. J., "Relaxing and Contracting Factors. Biological and Clinical Research," ed. by Vanhoutte P. M., Humana Press, Clifton, NJ, 1988, pp. 473-494.
- 16) Sunano S., Osugi S., Shimamura K., *Experientia*, **45**, 705-708 (1989).
- 17) Osugi S., Shimamura K., Sunano S., *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, **305**, 86-99 (1990).
- 18) Sekiguchi F., Adachi T., Matsubara H., Matsuda K., Kita K., Shimamura K., Sunano S., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **23**, 483-489 (1996).
- 19) Sunano S., Sekiguchi F., Nakamura A., Matsuda K., Yamamoto K., Shibutani T., Hashimoto H., Tanaka M., Shimamura K., *J. Smooth Muscle Res.*, **33**, 23-35 (1997).
- 20) Sasaki F., Yamamoto K., Shimamura K., Shibutani T., Hashimoto H., Tanaka M., Sunano S., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, S329-S330 (1995).

- 21) Sunano S., Itoh H., Isogai N., Osugi S., Yamamoto K., Shimamura K., *J. Vas. Med. Biol.*, **4**, 235–242 (1993).
- 22) Sunano S., Osugi S., Kaneko K., Yamamoto K., Shimamura K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **19**, 602–609 (1992).
- 23) Konishi M., Su C., *Hypertension*, **5**, 881–886 (1983).
- 24) Shimamura K., Osugi S., Moriyama K., Sunano S., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**, S133–S136 (1991).
- 25) Matsuda K., Sekiguchi F., Miyake Y., Inoue S., Shimamura K., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **34**, 207–219 (1998).
- 26) Sunano S., Sekiguchi F., Takeuchi K., Shibutani S., Matsuda K., Shimamura K., *Clin. Exp. Hypertension*, **18**, 873–890 (1996).
- 27) Clozel M., Kuhn H., Hefti F., *Hypertension*, **16**, 532–540 (1990).
- 28) Iwama Y., Kato T., Muramatsu M., Asano H., Shimizu K., Toki Y., Miyazaki Y., Okumura K., Hashimoto H., Ito T., Satake T., *Hypertension*, **19**, 326–332 (1992).
- 29) Sugimoto T., Tobian L., Ganguli M. C., *Hypertension*, **11**, 579–585 (1988).
- 30) Kato T., Iwama Y., Okamura K., Hashimoto H., Ito T., Satake T., *Hypertension*, **15**, 475–481 (1990).
- 31) Koga T., Takata Y., Kobayashi K., Takishita S., Yamashita Y., Fujishima M., *Hypertension*, **14**, 542–548 (1989).
- 32) Sekiguchi F., Miyake Y., Hirakawa A., Nakahira T., Yamaoka M., Shimamura K., Yamamoto K., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **37**, 67–79 (2001).
- 33) Küng C. F., Lüscher T. F., *Hypertension*, **25**, 194–200 (1995).
- 34) Wirth K. J., Linz W., Wiemer G., Scchölkens B. A., *Naunyn-Smiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **354**, 38–43 (1996).
- 35) Dyer S. M., Frewin D. B., Head R. J., *Blood Pressure*, **1**, 247–253 (1992).
- 36) Kauser K., Rubanyi G. M., *Hypertension*, **25**, 517–523 (1995).
- 37) Soloviev A. I., Stefanov A. V., Bazilyuk O. V., Sagch V. F., *J. Hypertens.*, **11**, 623–627 (1993).
- 38) Koga T., Takata Y., Kobayashi K., Takishita S., Yamashita Y., Fujishima M., *J. Hypertens.*, S243–S245 (1988).
- 39) Tesfamariam B., Ogletree M. L., *Am. J. Physiol.*, **269**, H189–H194 (1995).
- 40) Volpe M., Iaccarino G., Vecchione C., Rizzoni D., Russo R., Rubattu S., Condoreli G., Ganten U., Trimarco B., Lindpaintner K., *J. Clin. Invest.*, **98**, 256–261 (1996).
- 41) Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., *Hypertension*, **8**, II55–II60 (1986).
- 42) Hong H.-J., Wu C.-C., Yen M.-H., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **25**, 600–606 (1998).
- 43) Tominaga M., Fujii K., Abe I., Tanaka Y., Kobayashi K., Fujishima M., *J. Hypertens.*, **12**, 259–268 (1994).
- 44) Sunano S., Watanabe H., Tanaka S., Sekiguchi F., Shimamura K., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 709–716 (1999).
- 45) Sunano S., Nakahira T., Kawata K., Sekiguchi F., *Eur. J. Pharmacol.*, **423**, 47–55 (2001).
- 46) Watt P. A. C., Thurston H., *J. Hypertens.*, **7**, 661–666 (1989).
- 47) Pourageaud F., Freslone J. L., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **9**, 37–43 (1995).
- 48) Tesfamariam B., Halpern W., *Hypertension*, **11**, 440–444 (1988).
- 49) LeMarquer-Domegala F. L., Finet M., *Br. J. Pharmacol.*, **121**, 588–594 (1997).
- 50) Li J., Bian K., Bukoski R. D., *Am. J. Med. Sci.*, **307**, 7–14 (1994).
- 51) Takase H., Dohi Y., Kojima M., Sato K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **23**, 326–330 (1994).
- 52) Criscione L., Powell J. R., *Nigerian J. Physiol. Sci.*, **6**, 42–49 (1990).
- 53) Shimamura K., Sekiguchi F., Matsuda K., Yamamoto K., Tanaka S., Sunano S., Shibutani T., Hashimoto H., Tanaka M., *Eur. J. Pharmacol.*, **344**, 161–168 (1998).
- 54) Liu H., Ledingham J. M., Mullaney I., Lavery R., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **29**, 405–411 (2002).
- 55) Kähönen M., Arvolta P., Wu X., Pörsti I., *Naunyn-Schiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **349**, 624–636 (1994).
- 56) Dohi Y., Thiel M. A., Bühler F. R., Lüscher T. F., *Hypertension*, **15**, 170–179 (1990).
- 57) Onaka U., Fujii K., Abe I., Fujishiman M., *Circulation*, **98**, 175–182 (1998).

- 58) Fu-Xiang D., Jameson M., Skopec J., Diederich A., Diederich D., *J. Vasc. Res.*, **29**, 117-118 (1992).
- 59) Suzuki H., Zweifach B. W., Schmid-Schönbein G. W., *Hypertension*, **26**, 397-400 (1995).
- 60) Li J., Bukoski R., *Circ. Res.*, **72**, 290-296 (1993).
- 61) Jameson M., Dai F.-X., Lüscher T. F., Skopec J., Diederich A., Diederich D., *Hypertension*, **21**, 280-288 (1993).
- 62) Diederich D., Yang Z., Bühler F. R., Lüscher T. F., *Am. J. Physiol.*, **258**, H445-H451 (1990).
- 63) Ito S., Carretero O. A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**, S187-S189 (1992).
- 64) Bennett M. A., Hiller C., Thurston H., *J. Hypertens.*, **14**, 389-397 (1996).
- 65) Wu C.-C., Chen S.-J., Yen M.-H., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **30**, 245-252 (1997).
- 66) Qiu H. Y., Henrion D., Benessiano J., Heymes C., Tournier B., Levy B. I., *Hypertension*, **32**, 1098-1103 (1998).
- 67) Shimamura K., Sekiguchi F., Matsuda K., Ozaki M., Noguchi K., Yamamoto K., Shibano T., Tanaka M., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **36**, 33-46 (2000).
- 68) Hongo K., Nakagomi T., Kassel N. F., Sasaki T., Lehman M., Vollmer D. G., Tsukahara T., Ogawa H., Torner J., *Stroke*, **19**, 892-897 (1988).
- 69) Mayhan W. G., Faraci F. M., Heistad D. D., *Am. J. Physiol.*, **253**, H435-H440 (1987).
- 70) Mayhan W. G., *Am. J. Physiol.*, **262**, H539-H543 (1992).
- 71) Mayhan W. G., *Am. J. Physiol.*, **259**, H1455-H1462 (1990).
- 72) Yokota Y., Imaizumi Y., Asano M., Matsuda T., Watanabe M., *Br. J. Pharmacol.*, **113**, 324-330 (1994).
- 73) Yang S.-T., Mayhan W. G., Faraci F. M., Heistad D., *Hypertension*, **17**, 612-618 (1991).
- 74) Hayakawa H., Hirata Y., Suzuki E., Sugimoto T., Matsuoka H., Kikuchi K., Nagano T., Hirobe M., Sugimoto A., *Am. J. Physiol.*, **264**, H1535-H1541 (1993).
- 75) Fu-Xiang D., Diederich A., Skopec J., Diederich D., *J. Vasc. Res.*, **29**, 117 (1992).
- 76) Dohi Y., Kojima M., Sato K., *Hypertension*, **28**, 58-63 (1996).
- 77) Fu-Xiang D., Skopec J., Diederich A., Diederich D., *Hypertension*, **19**, 795-798, (1992).
- 78) Kajimoto N., Ogawa H., Suzuki A., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, S154-S156 (1995).
- 79) Koller A., Huang A., *Circ. Res.*, **74**, 416-421 (1994).
- 80) Mantelli L., Amerni S., Ledda F., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **25**, 595-602 (1995).
- 81) Radaelli A., Mircoli L., Mori I., Mancina G., Ferrari U., *Hypertension*, **32**, 735-739 (1998).
- 82) Onda T., Mashiko S., Hamano M., Tomita I., Tomita T., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **21**, 857-863 (1994).
- 83) Sim M. K., Chua M. E., *Jpn. J. Pharmacol.*, **39**, 551-553 (1985).
- 84) Cachofeiro V., Nasjletti A., *Hypertension*, **18**, 683-688 (1991).
- 85) Dohi Y., Criscione L., Pfeiffer K., Lüscher T. F., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **24**, 372-379 (1994).
- 86) Matsuda K., Sekiguchi K., Yamamoto K., Shimamura K., Sunano S., *Eur. J. Pharmacol.*, **392**, 61-70 (2000).
- 87) Lockette W., Otsuka Y., Carretero O., *Hypertension*, **8**, II61-II66 (1986).
- 88) Van de Voorde J., Leusen I., *Am. J. Physiol.*, **250**, H711-H717 (1986).
- 89) Fortes Z. B., Nigro D., Scivoletto R., de Carvalho M. H. C., *J. Hypertens.*, **8**, 1043-1048 (1990).
- 90) Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., Raji L., *Hypertension*, **9**, III193-III197 (1987).
- 91) Van de Voorde J., Vanheel B., Leusen I., *Circ. Res.*, **70**, 1-8 (1992).
- 92) Hoshino J., Sakamaki T., Nakamura T., Kobayashi M., Kato M., Sakamoto H., Kurashina T., Yagi A., Sato K., Ono Z., *Circ. Res.*, **74**, 130-138 (1994).
- 93) Bennett M. A., Thurston H., *Clin. Sci.*, **90**, 21-29 (1996).
- 94) Van de Voorde J., Vanheel B., Leusen I., *Pflügers Arch.*, **411**, 500-504 (1988).
- 95) Miller M. J. S., Pinto A., Mullane K. M., *Hypertension*, **10**, 164-170 (1987).
- 96) Winquist R. J., Bunting P. B., Baskin E. P., Wallace A. A., *J. Hypertens.*, **2**, 541-545

- (1984).
- 97) Bockman C. S., Jeffries W. S., Pettinger W. A., Abel P. W., *Hypertension*, **20**, 304–313 (1992).
  - 98) Sekiguchi F., Yamamoto K., Matsuda K., Kawata K., Negishi M., Shinomiya K., Shimamura K., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **38**, 131–144 (2002).
  - 99) Lüscher T. F., Diederich D., Weber E., Vanhoutte P. M., Bühler F. R., *Hypertension*, **11**, 537–578 (1988).
  - 100) Hayashi K., Matsuda H., Nagahama T., Fujiwara K., Ozawa Y., Kubota E., Honda M., Tokuyama H., Saruta T., *Hypertens. Res.*, **22**, 31–37 (1999).
  - 101) Ghisda P., Godfraind T., Morel N., *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1513–1523 (1999).
  - 102) Moncada S., Palmer R. M. J., Higgs E. A., *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109–142 (1991).
  - 103) Pearson P. J., Vanhoutte P. M., *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **122**, 1–67 (1993).
  - 104) Palmer R. M. J., Rees D. D., Ashton D. S., Moncada S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1251–1256 (1998).
  - 105) Rees D. D., Palmer R. M. J., Schulz R., Hodson H. F., Moncada S., *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 746–752 (1990).
  - 106) Moore P. K., al-Swayeh O. A., Chong N. W. S., Evans R. A., Gibson A., *Br. J. Pharmacol.*, **99**, 408–412 (1990).
  - 107) Kaneko K., Sunano S., *Eur. J. Pharmacol.*, **240**, 195–200 (1993).
  - 108) Lang M. G., Noll G., Lüscher T. F., *Am. J. Physiol.*, **269**, H837–H844 (1995).
  - 109) Takase H., Moreau P., Küng C. F., Nava E., Lüscher T. F., *Hypertension*, **27**, 25–31 (1996).
  - 110) Adeagbo A. S. O., Tabrizchi R., Triggle C. R., *Br. J. Pharmacol.*, **111**, 13–20 (1994).
  - 111) Briones A. M., Alonso M. J., Marín J., Salices M., *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 111–120 (1999).
  - 112) Hayakawa H., Hirata Y., Suzuki E., Kakoki M., Kikuchi K., Nagano T., Hiribe M., Omata M., *Life Sci.*, **56**, 401–408 (1995).
  - 113) Hirata Y., Hayakawa H., Kakoki M., Tojo A., Suzuki E., Kimura K., Goto A., Kikuchi K., Nagano T., Hirobe M., Omata M., *Hypertension*, **27**, 672–678 (1996).
  - 114) Hayakawa H., Hirata Y., Kimura K., Kikuchi K., Nagao T., Hirobe M., Omata M., *Hypertension*, **23**, 752–756 (1994).
  - 115) Malinski T., Kapturczak M., Dayharsh J., Bohr D., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 654–658 (1993).
  - 116) Huang P. L., Huang Z., Mashimo H., Bloch K. D., Moskowitz M. A., Bevan J. A., Fishman M. C., *Nature*, **377**, 239–242 (1995).
  - 117) Sawada Y., Sakamaki T., Nakamura T., Sato K., Ono Z., Murata K., *J. Hypertens.*, **12**, 745–750 (1994).
  - 118) Hong H.-J., Loh S.-H., Yen M.-H., *Br. J. Pharmacol.*, **131**, 631–637 (2000).
  - 119) Sunano S., Zou L.-B., Matsuda K., Sekiguchi F., Watanabe H., Shimamura K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **27**, 733–739 (1996).
  - 120) Shimamura K., Matsuda K., Yamamoto K., Sunano S., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **22**, S144–145 (1995).
  - 121) Boulanger C. M., Morrison K. J., Vanhoutte P. M., *Br. J. Pharmacol.*, **112**, 519–524 (1994).
  - 122) Lüscher T. F., Romero J. C., Vanhoutte P. M., *J. Hypertens.*, **4**, S81–S83 (1986).
  - 123) Lüscher T. F., Vanhoutte P. M., *Hypertension*, **8**, 344–348 (1986).
  - 124) Ito T., Kato T., Iwama Y., Muramatsu M., Shimizu K., Asano H., Okumura K., Hashimoto H., Satake T., *J. Hypertens.*, **9**, 729–736 (1991).
  - 125) Ge T., Hughes H., Junquero D. C., Wu K. K., Vanhoutte P. M., Boulanger C. M., *Circ. Res.*, **76**, 1003–1010 (1995).
  - 126) Rinaldi G., Bohr D., *Hypertension*, **13**, 256–261 (1989).
  - 127) Furchgott R. F., Vanhoutte P. M., *FASEB J.*, **3**, 2007–2018 (1989).
  - 128) Cosentino F., Sill C. J., Katusić Z. S., *Hypertension*, **23**, 229–235 (1994).
  - 129) Auch-Schwelk W., Katusić Z. S., Vanhoutte P. M., *Hypertension*, **15**, 699–703 (1990).
  - 130) Lin L., Balazy M., Pagano P. J., Nasjiletti A., *Circ. Res.*, **74**, 197–205 (1994).
  - 131) Clozel M., *Hypertension*, **18**, II37–II42 (1991).
  - 132) Miyauchi T., Ishikawa T., Tomobe Y., Yagisawa M., Kimura S., Sugishita Y., Ito I., Goto K., Masaki T., *Hypertension*, **14**, 427–

- 434 (1989).
- 133) Bolger G. T., Liard F., Jodoin A., Jaramillo J., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **69**, 406–413 (1991).
- 134) Wu C.-C., Bohr D. F., *Hypertension*, **19**, 677–681 (1990).
- 135) Dohi Y., Hahn A. W. A., Boulanger C. M., Bühler F. R., Lüscher T. F., *Hypertension*, **19**, 131–137 (1992).
- 136) Mortensen L. H., Pawloski C. M., Kanagy N. L., Fink G. D., *Hypertension*, **15**, 729–733 (1990).
- 137) Nishikibe M., Tsuchida S., Okada M., Fukuroda T., Shimamoto K., Yano M., Ishikawa K., Ikemoto F., *Life Sci.*, **52**, 712–724 (1993).
- 138) Dohi Y., Lüscher T. F., *Hypertension*, **18**, 543–549 (1991).
- 139) Saito Y., Nakao K., Mukoyama M., Shirakami G., Itoh H., Yamada T., Arai H., Hosoda K., Suga S., Jougasaki M., Ogawa Y., Nakajima S., Ueda M., Imura H., *Hypertension*, **15**, 734–738 (1990).
- 140) Tomobe Y., Miyauchi T., Saito A., Yanagisawa M., Kimura S., Goto K., Masaki T., *Eur. J. Pharmacol.*, **152**, 373–374 (1988).
- 141) Tomobe T., Ishikawa T., Yanagisawa M., Kimura S., Masaki T., Goto K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **257**, 555–561 (1991).
- 142) Mir A. K., Berthold H., Scholtysik G. E., Fozard J. R., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **340**, 424–430 (1989).
- 143) Edwards G., Thollon C., Gardener M. J., Félétou M., Vilaine J.-P., Vanhoutte P. M., Weston A. H., *Br. J. Pharmacol.*, **129**, 1145–1154 (2000).
- 144) Fujii K., Tominaga M., Ohmori S., Kobayashi K., Koga T., Tanaka Y., Fujishima M., *Circ. Res.*, **70**, 660–669 (1992).
- 145) Fujii K., Ohmori S., Tominaga M., Abe I., Tanaka Y., Ohya Y., Kobayashi K., Fujishima M., *Am. J. Physiol.*, **265**, H509–H516 (1993).
- 146) Yamamoto Y., Imaeda K., Suzuki H., *J. Physiol.*, **514**, 505–513 (1999).
- 147) Sadanaga T., Ohya Y., Ohtsubo T., Goto K., Fujii K., Abe I., *Hypertens. Res.*, **26**, 589–596 (2002).
- 148) Auch-Schewelk W., Katusić Z. S., Vanhoutte P. M., *Hypertension*, **19**, 442–445 (1992).
- 149) Hazama F., Ozaki T., Amano S., *Stroke*, **10**, 245–252 (1979).
- 150) Ciriaco E., Abbate F., Frrante F., Laurà R., Amenta F., *J. Hypertens.*, **11**, 515–522 (1993).
- 151) Hüttner I., Costabella P. M., De Chastonay C., Gabbiani G., *Lab. Invest.*, **46**, 489–504 (1982).
- 152) Martin W., “Biological and Clinical Research,” Humana Press, Clifton, NJ, 1988, pp. 159–178.
- 153) Miller R. C., Schini V., Schoeffter P., “Relaxing and Contracting Factors. Biological and Clinical Research,” ed. by Vanhoutte P. M., Humana Press, Clifton, NJ, 1988, pp. 241–265.
- 154) Carrier G. O., White R. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**, 682–687 (1985).
- 155) Matsuda K., Sekiguchi F., Tojo M., Shimamura K., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **31**, 51–60 (1995).
- 156) Sunano S., Hosogi Y., Shimamura K., *J. Vasc. Med. Biol.*, **3**, 251–255 (1991).
- 157) Gil-Longo J., Frez-Grndal D., Álvarez M., Siera M., Orallo F., *Eur. J. Pharmacol.*, **310**, 175–183 (1996).
- 158) Sekiguchi F., Matsuda K., Shimamura K., Takeuchi K., Sunano S., *J. Smooth Muscle Res.*, **34**, 221–232 (1998).
- 159) Sunano S., Osugi S., Yamamoto K., Shimamura K., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **17**, S137–S140 (1991).
- 160) Sunano S., Shimamura K., “Ion Channels of Smooth Muscle Cells and Endothelial Cells,” eds. by Sperelakis N., Kuriyama H., Elsevier, New York, 1991, pp. 225–233.
- 161) Pucci M. L., Miller K. B., Dick L. B., Guan H., Lin L., Nasjletti A., *Hypertension*, **23**, 744–751 (1994).
- 162) Yamazaki J., Fujita N., Nagao T., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **259**, 52–57 (1991).
- 163) Rubanyi G. M., Vanhoutte P. M., *Am. J. Physiol.*, **250**, H822–H827 (1986).
- 164) Gryglewski R. J., Palmer R. M. J., Moncada S., *Nature*, **320**, 454–456 (1986).
- 165) Laight D. W., Kaw A. V., Carrier M. J., Änggård E. E., *Br. J. Pharmacol.*, **124**, 238–244 (1998).
- 166) MacKenzie A., Martin W., *Br. J. Pharmacol.*,

- 124, 719–728 (1998).
- 167) de Saram K., McNeill K. L., Khokher S., Ritter J. M., Chowieńczyk P. J., *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 1044–1050 (2002).
- 168) Ellis A., Li C. G., Rand M. J., *Eur. J. Pharmacol.*, **356**, 41–47 (1998).
- 169) Miyamoto Y., Akaike T., Yoshida M., Goto S., Horie H., Maeda H., *Proc. Soc. Exp. Med.*, **211**, 366–373 (1996).
- 170) Grunfeld S., Hamilton C. A., Mesaros S., McClain S. W., Dominiczak A. F., Bohr D. F., Malinski T., *Hypertension*, **26**, 854–857 (1995).
- 171) Nakazono K., Watanabe N., Matsuno K., Sasaki J., Sato T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10045–10048 (1991).
- 172) Urabo J., Soma M., Nakayama T., Kanmatsuse K., *Am. J. Hypertens.*, **11**, 125–128 (1998).
- 173) Lacolley P., Gautier S., Porier O., Pannier O., Cambien F., Benetos A., *J. Hypertens.*, **16**, 31–35 (1998).
- 174) Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N., Yoshimura M., Shimasaki Y., Nakayama M., Kamitani S., Harada M., Ishikawa M., Kuwahara K., Ogawa E., Hamanaka I., Takahashi N., Kaneshige T., Teraoka H., Akamizu T., Azuma N., Yoshimasa Y., Yoshimasa T., Itoh H., Masuda I., Yasue H., Nakao K., *Hypertension*, **32**, 3–8 (1998).
- 175) Lake-Bruse K. D., Faraci F.M., Shesely E. G., Maeda N., Sigmond C. D., Heistad D. D., *Am. J. Physiol.*, **277**, H770–H776 (1999).
- 176) Alexander M. Y., Brosnan M. J., Hamilton C. A., Downie P., Devilin A. M., Dowell F., Martin W., Prentice H. M., O'Brien T., Dominiczak A. F., *Cardiovasc. Res.*, **43**, 798–807 (1999).
- 177) Nakane H., Millar F. J., Faraci F. M., Toyoda K., Heistad D. D., *Hypertension*, **35**, 595–602 (2000).
- 178) Lin K. F., Chao L., Chao J., *Hypertension*, **30**, 307–313 (1997).
- 179) Somers M. J., Mavromatis K., Galis Z. S., Harrison D. G., *Circulation*, **101**, 1722–1728 (2000).
- 180) Kähönen M., Mäkynen H., Wu X., Alvola P., Pörsti I., *Br. J. Pharmacol.*, **115**, 859–867 (1995).
- 181) Lüscher T. F., Raji L., Vanhoutte P. M., *Hypertension*, **9**, 157–163 (1987).
- 182) Harada S., Nakata T., Oguni A., Kido H., Hatta T., Fukuyama R., Fushiki S., Sasaki S., Takada K., *Hypertens. Res.*, **25**, 779–786 (2002).
- 183) Aisaka K., Gross S. S., Griffith O. W., Levi R., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 881–886 (1989).
- 184) Rees D. D., Palmer R. M. J., Moncada S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 3375–3378 (1989).
- 185) Yamamoto K., Shimamura K., Sekiguchi F., Sunano S., *Clin. Exp. Hypertens.*, **23**, 533–544 (2001).
- 186) Fozard J. R., Part M.-L., *Br. J. Pharmacol.*, **102**, 823–826 (1991).
- 187) Toda N., Kitamura Y., Okamura T., *Hypertension*, **21**, 3–8 (1993).
- 188) Dananberg J., Sider R. S., Grekin R. J., *Hypertension*, **21**, 359–363 (1993).
- 189) Vargas F., Osuna A., Fernández-Rivas A., *J. Hypertension*, **14**, 373–379 (1996).
- 190) Jover B., Herizi A., Ventre F., Dupont M., Mimran A., *Hypertension*, **21**, 944–948 (1993).
- 191) Baylis C., Mitruka B., Deng A., *J. Clin. Invest.*, **90**, 278–281 (1992).
- 192) Zhao H., Shimokawa H., Uragami-Harasawa L., Igarashi H., Takeshita A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **33**, 554–566 (1999).
- 193) Zanchi A., Aubert J. F., Brunner H., Waeber B., *Cardiovasc. Res.*, **30**, 122–129 (1995).
- 194) Takemoto M., Egashira K., Usui M., Numaguchi K., Tomita H., Tsutsui H., Shimokawa H., Sueishi K., Takeshita A., *J. Clin. Invest.*, **99**, 278–287 (1997).
- 195) Takahashi H., Hara K., Komiya Y., Masuda M., Murakami T., Nishimura M., Nanbu A., Yoshimura M., *Hypertens. Res.*, **18**, 319–324 (1993).
- 196) Sander M., Hansen P. G., Victor R. G., *Hypertension*, **26**, 691–695 (1995).
- 197) Qiu C., Engels K., Samsell L., Baylis C., *Hypertension*, **25**, 61–66 (1995).
- 198) Numaguchi K., Egashira K., Takemoto M., Kadokami T., Shimaoka H., Sueishi K., Takeshita A., *Hypertension*, **26**, 957–962 (1995).

- 199) Riberio M. O., Antunes E., de Nucci G., Lovisola S. M., Zatz R., *Hypertension*, **20**, 298–303 (1992).
- 200) Matsuoka H., Nishida H., Nomura G., Van Vliet B. N., Toshima H., *Hypertension*, **23**, 971–975 (1994).
- 201) Manning R. D. Jr., Hu L., Mizelle H. L., Montani J.-P., Norton M. W., *Hypertension*, **22**, 40–48 (1993).
- 202) Henrion D., Dowell F. J., Levy B. I., Michel J.-B., *Hypertension*, **28**, 361–366 (1996).
- 203) Ito A., Egashira K., Kaokami T., Fukumoto Y., Takayanagi T., Nakaike R., Kuga T., Sueishi K., Shimokawa H., Takeshita A., *Circulation*, **92**, 2636–2644 (1995).
- 204) Gardiner S. M., Kemp P. A., Bennett T., Palmer R. M., Moncada S., *Eur. J. Pharmacol.*, **213**, 449–451 (1992).
- 205) Aisaka K., Mitani A., Kitijima Y., Ishihara Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **54**, 461–463 (1990).
- 206) Rees D., Ben-Ishay D., Moncada S., *Hypertension*, **28**, 367–371 (1996).
- 207) Togashi H., Sakuma I., Yoshioka M., Kobayashi T., Yasuda H., Kitabatake A., Saito H., Gross S. S., Levi R. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 343–347 (1992).
- 208) Harada S., Tokunaga S., Momohara M., Masaki H., Tagawa T., Imaizumi T., Takeshita A., *Circ. Res.*, **72**, 511–516 (1993).
- 209) Hansen J., Jacobsen T. N., Victor R. G., *Hypertension*, **24**, 439–444 (1994).
- 210) Yoshida M., Imaizumi T., Ando S., Hirooka Y., Harada S., Takeshita A., *Heart Vessels*, **6**, 218–223 (1991).
- 211) Hirooka Y., Imaizumi T., Masaki H., Ando S., Harada S., Momohara M., Takeshita A., *Hypertension*, **20**, 175–180 (1992).
- 212) Panza J. A., Quyyumi A. A., Callahan T. S., Eptein S. E., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **21**, 1145–1151 (1993).
- 213) Taddei S., Viridis A., Mattei P., Arzilli F., Salvetti A., *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **20**, S193–S195 (1992).
- 214) Treasure C. B., Manoukian S. V., Klein J. L., Vita J. A., Nebel E. G., Renwick G. H., Selwyn A. P., Alexander R. W., Ganz P., *Circ. Res.*, **71**, 776–781 (1992).
- 215) Cockcroft J. R., Chowienzyk P. J., Benjamin N., Ritter J. M., *New Engl. J. Med.*, **330**, 1036–1040 (1994).
- 216) Haynes G., Noon J. P., Walker B. R., Webb D. J., *J. Hypertension*, **11**, 1375–1380 (1993).
- 217) Sekiguchi F., Nakahira T., Kawata K., Sunano S., *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **29**, 1066–1075 (2002).