

ブタ舌動脈血管平滑筋における 各種血管拡張物質による一酸化窒素の変化

山田 大爾, 佐藤 健一

岩手医科大学歯学部口腔外科学講座歯科麻酔学分野

(主任: 城 茂治 教授)

(受付: 2012年1月6日)

(受理: 2012年1月17日)

内皮由来弛緩因子 (以下 EDRF) の主体である一酸化窒素 (以下 NO) は血液循環の恒常性を維持する重要な役割を担っているが, これに関する口腔領域の血管での報告は渉猟しえた範囲ではみられなかった. そこで本研究は, NO の血管への作用とその機序を解明する目的で, ブタ舌動脈血管平滑筋にノルアドレナリンを投与した際に発生する収縮に対して, 各種血管拡張物質 (Acetylcholine, Carbachol, Pilocarpine) を投与した時の NO の変化を電極法を用いて直接的に測定した. また, 同時に血管の等尺性収縮張力 (以下 tension) と細胞内カルシウムイオン濃度 (以下 $[Ca^{2+}]_i$) を測定して NO との関係について検討した.

材料はブタ舌動脈を長さ 3 mm の血管平滑筋輪状標本に作製し, 蛍光カルシウム指示薬を負荷した. tension, カルシウム蛍光強度比 (以下 ratio, この値をもって $[Ca^{2+}]_i$ 変化とした.) および NO を同時に測定した. 始めに 5 μ M のノルアドレナリン (以下 NA) を灌流し, この時に発生した tension と ratio の最高値を基準値 100% とした. 次に 3 μ M, 30 μ M, 300 μ M の各種血管拡張物質を灌流した. この間の tension, ratio および NO を測定し, 以下の結果を得た.

1. 電極法による NO の直接的な測定は, 正確であり, 経時的な NO の測定に有用である.
2. ACh では, ACh 濃度が増加するほど NO の放出は減少したが, NO の増加とともに NA による舌動脈血管平滑筋収縮を抑制した. $[Ca^{2+}]_i$ は NO の増加とともに抑制される傾向がみられたが, 濃度によって異なった変動がみられた.
3. Carbachol では, 濃度依存的に NO が放出された. 各濃度において $[Ca^{2+}]_i$ の変化はほとんどみられなかったが, 収縮は有意に抑制された.
4. Pilocarpine では, 濃度依存的に NO が放出され, NA による収縮を濃度依存的に抑制する傾向を示した. $[Ca^{2+}]_i$ は, 各濃度ともにほぼ同程度の抑制を示した.

Changes of nitric oxide (NO) by various vasodilators in vascular smooth muscle of swine lingual artery
Daiji YAMADA, Kenichi SATOH
Division of Dental Anesthesiology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry,
Iwate medical University
(Chief: Prof. Shigeharu Joh)
1-3-27, Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

緒 言

当教室では、これまで局所麻酔薬や各種血管収縮薬によるブタ舌動脈血管平滑筋への影響を、その収縮張力の変化と細胞内カルシウムイオン濃度（以下 $[Ca^{2+}]_i$ ）の変化を同時に測定して検討してきた。とりわけ血管平滑筋収縮過程に注目し、何種類かの血管収縮薬や局所麻酔薬の作用機序などについて検討した結果、血管平滑筋の収縮には $[Ca^{2+}]_i$ の変化が大きく関与していること、そしてその変化には細胞外からの Ca^{2+} の流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの放出・取り込みが関与することが確認できた¹⁾。一方、血管の拡張においては、血管平滑筋内皮からの内皮由来弛緩因子（endothelium-derived relaxing factor：以下 EDRF）が関与することが知られている²⁾。しかも、その主体は一酸化窒素（以下 NO）といわれており、血流増加や末梢血管抵抗の減少に寄与して血液循環の恒常性に重要な役割を担っていることも報告されている^{3~5)}。

そこで本研究は、EDRF の代表である NO の血管への作用とその機序を解明するため、ブタ舌動脈を用いて、Noradrenaline（以下 NA）を投与した際に発生する収縮に対して血管拡張物質である Acetylcholine（以下 ACh）、Carbachol および Pilocarpine を投与したときの NO 変化を直接的に測定した。また、同時に等尺性収縮張力（以下 tension）および $[Ca^{2+}]_i$ の変化の指標である蛍光強度比（以下 ratio）を測定し、NO 動態との関係を検討した。

材料と方法

1. 材料

屠殺ブタの舌から直径 2 mm の舌動脈を摘出および周囲組織と外膜を剥離除去した後、長さ 3 mm の舌動脈血管平滑筋輪状標本を作製した。血管内皮を温存した標本と血管内面をピンセットで擦過し、内皮を剥離した標本をそれぞれ作製した。

2. 蛍光カルシウム指示薬 Fura-2/AM の負荷

Fura-2/AM（同仁化学）20 μ M、0.01% Pluronic F-127（BASF）を溶解した Hanks Component Solutions（以下 HCS）に各標本を浸し、遮光した恒温槽（37 $^{\circ}$ C）で 3 時間浸漬した。HCS（pH 7.40）の組成は 0.34 mM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.44 mM KH_2PO_4 、0.8 mM $MgSO_4$ 、1.26 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、4.2 mM $NaHCO_3$ 、5.55 mM Glucose、5.36 mM KCl、140 mM NaCl とした。

3. NO センサーの較正

使用した NO センサーは、ガス透過性被膜処理がなされた直径 100 μ M の疎水性の炭素繊維で作られていて、溶液中の NO を感知して NO の濃度に応じてセンサーを流れる電流が変化するため、電流値（以下 current）を測定することによって NO 濃度を推定することができる。

なお、current から NO 濃度（nM）を求めるには、測定に先立ち、較正液を用いて較正直線を求める必要がある。そこで、10 ml の較正液（2.4 nM CuCl 溶液）に S-Nitroso-N-Acetyl-D, L-Penicillamine（SNAP）標準溶液をそれぞれ 10 μ l、20 μ l、40 μ l（100 nM、200 nM、400 nM）加え、その時に発生する current を NO 測定装置（APOLLO 4000TM, World Precision Instruments）で測定し、較正直線を求めた。

4. 測定方法（図 1）

tension および $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定は西ら⁶⁾の方法に準じた。はじめに標本を細胞内カルシウム測定装置（AQUACOSMOSTM, HAMA MATSU）の恒温槽内で一端をマニピレータ（M-152, ナリシゲ）に固定し、他端を張力トランスデューサ（UL-10GR, ミネピア）と接続されたタングステンワイヤに固定して tension を測定装置（Power LabTM, AD Instruments）で記録した。同時に $[Ca^{2+}]_i$ については、顕微鏡（TE-2000E, Nikon）下で測定部位を決定し、細胞内 Ca^{2+} 測定装置のキセノンランプから発する励起光を、340 nm と 380 nm のバンドパスフィルター付き回転盤を介して標本に照射し、二波長励起を行った。そして標本組織から発する蛍光を 500 nm のフィルターを介して光電子増幅管に導き、340 nm と 380 nm 励起蛍光を測

定し, その ratio (340 nm/380 nm) を $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標とした. NO は, 固定された標本内腔に L 型 NO センサー (ISO NOP30, World Precision Instruments) を接触しないように挿入し, 発生した current を測定した後, NO 濃度を校正直線から算出した.

5. 標本を設置していない状態での NA および各種血管拡張物質の NO センサーへの影響
各種試薬による NO センサーへの影響を調べる目的で, 恒温槽内に標本を設置していない状態で NA および各種血管拡張物質 (ACh, Carbachol, Pilocalpine) 含有の HCS をそれぞれ 30 分間灌流したときの current を測定した.

6. 血管内皮の有無による NA の tension, ratio および current の変化に対する ACh 投与の影響

1) 血管内皮を剥離した標本について

内皮を剥離した標本を恒温槽内 (容量 1.2 ml) に固定し, 静止張力 1.0 g を負荷した状態で 30°C の HCS を流速 2 cm/sec で 30 分間灌流し,

標本が安定するのを待った後, 5 μ M NA 含有 HCS を 15 分間灌流した. このときに生じた tension と ratio の最大値を測定し, 基準値 (100%) とした. さらに 5 μ M NA および 3 μ M, 30 μ M, 300 μ M の ACh を含有した HCS を追加灌流し, その時に発生した tension, ratio および current を経時的に 15 分間測定した.

2) 血管内皮を温存した標本について

内皮を剥離した標本と同様に, 5 μ M NA 含有 HCS を 15 分間灌流し, tension と ratio の最大値を測定して基準値 (100%) を求めた. さらに 5 μ M NA および 3 μ M, 30 μ M, 300 μ M の ACh を含有した HCS を追加灌流し, そのときに発生した tension, ratio および current を経時的に 15 分間測定した.

7. 血管内皮を温存した標本での NA の tension, ratio および current の変化に対する Carbachol, Pilocalpine 投与の影響

内皮を温存した標本で 5 μ M NA 含有 HCS を 15 分間灌流し, tension と ratio の最高値を

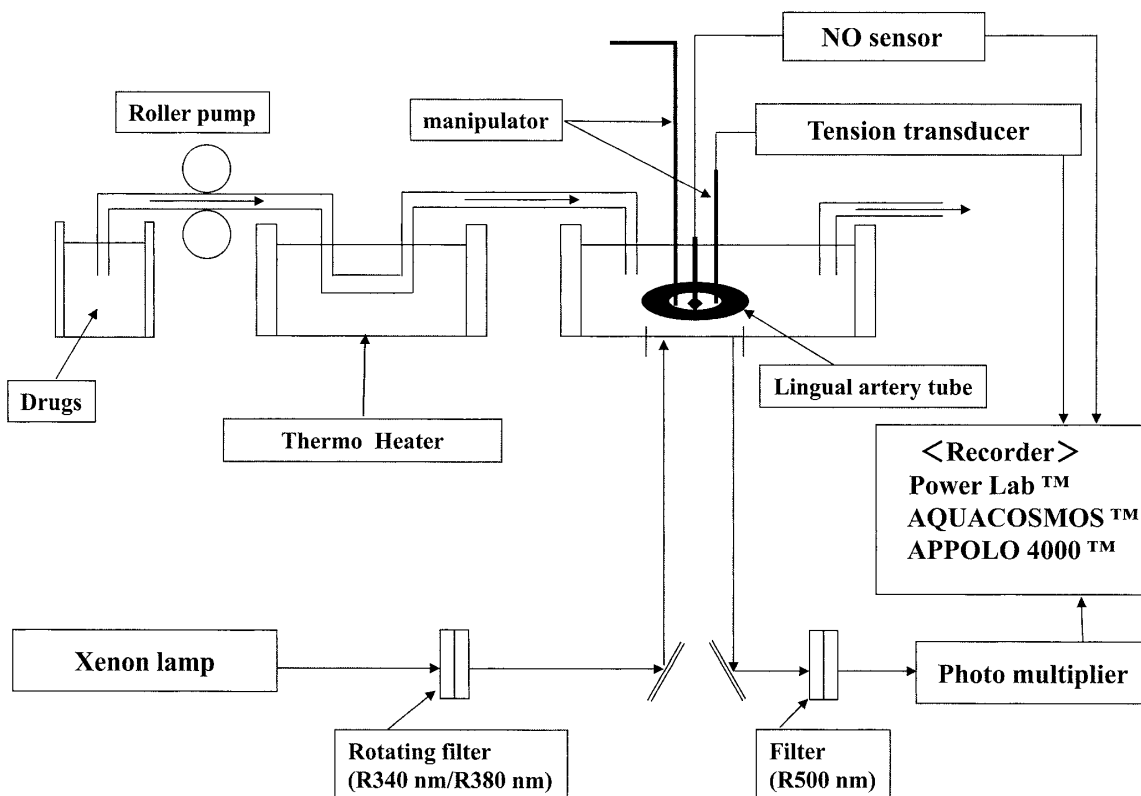


図1 測定装置ダイアグラム

測定して基準値 (100%) を求めた. さらに 5 μ M NA および 3 μ M, 30 μ M, 300 μ M の Carbachol, Pilocarpine を含有した HCS をそれぞれに追加灌流し, そのときに発生した tension, ratio および current を経時的に 15 分間測定した (図 2).

8. 統計学的処理

SPSS を用いて, 群間および群内比較において一元配置分散分析をおこなった後, 多重比較検定 (Dunnet) で検討した. 危険率 5% 未満を有意差ありとし, 測定値は平均 \pm 標準誤差で表した. また, 各種血管拡張物質における NO の放出に関連する要因をみるために NO を目的変数, その他 (time, tension, ratio) を説明変数とした重回帰分析をおこなった.

結 果

1. NO の校正直線

NO 濃度と current の間には相関係数 0.916

の高い相関が得られた (図 3).

2. NA および各種血管拡張物質の NO センサーへの影響 (図 4)

1) NA のみ投与した場合

NA を投与すると 200 pA 前後の current の増加がみられた (図 4a).

2) 標本を設置していない状態での NA を投与後に ACh を追加投与した場合

NA を投与すると current は徐々に増加し, NA 投与中はほとんど変化がみられなかった. その後, 300 μ M の ACh を追加投与してもほとんど変化はみられなかった (図 4b). Carbachol と pilocarpine を同様に追加投与しても変化はみられなかった.

3) ACh, Carbachol および Pilocarpine をそれぞれ単独投与した場合

300 μ M の ACh, Carbachol および Pilocarpine をそれぞれ単独で投与しても current の変化はみられなかった (図 4c).

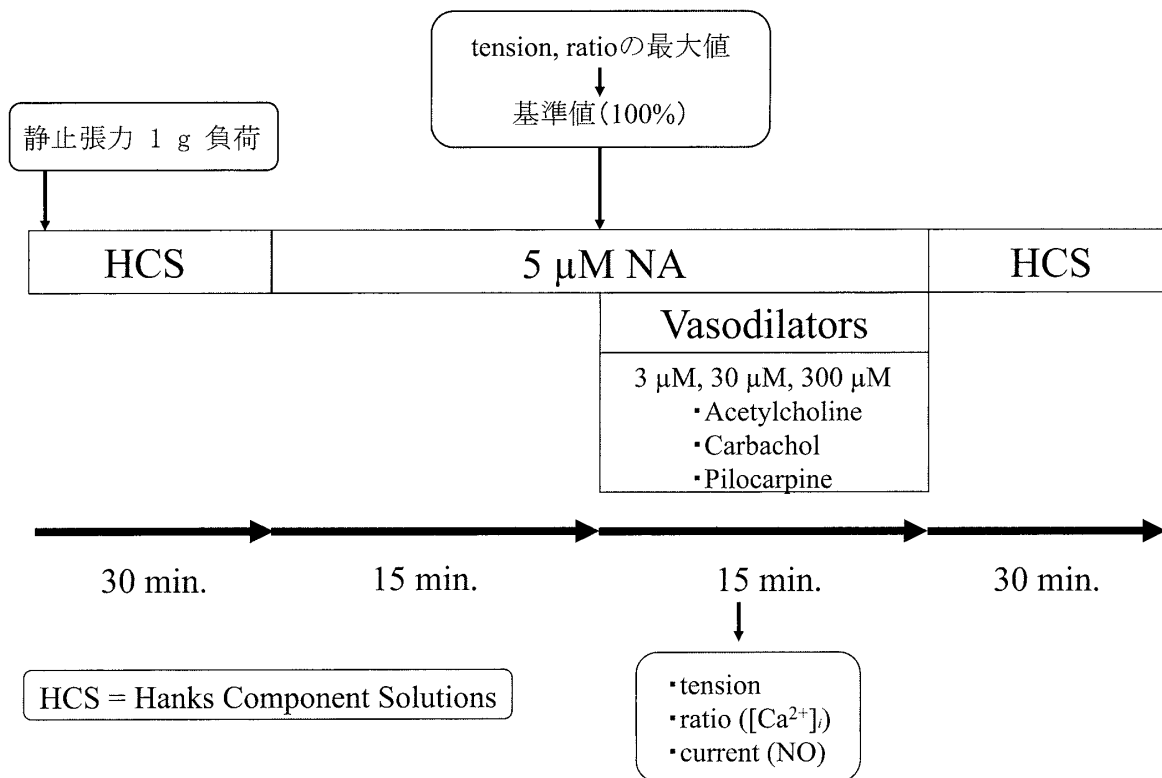


図 2 研究方法

測定に先立ち輪状標本に静止張力 1 g を負荷し, HCS を 30 分間灌流して研究系の安定を得た. その後, 5 μ M NA を 15 分間灌流した後, 各種血管拡張薬を 15 分間灌流し, 変化を測定した.

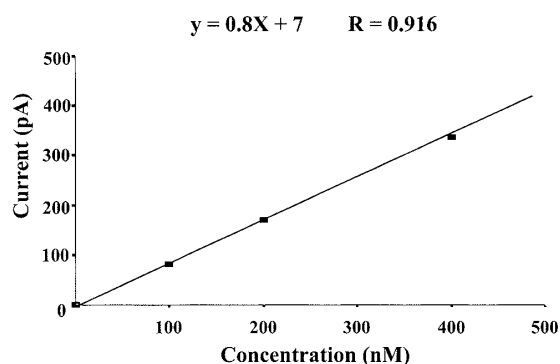


図3 較正直線

NO 濃度と current の間には常に相関係数 0.9 以上の高い相関があった

3. 血管内皮の有無による NA の tension, ratio および current の変化に対する ACh 投与の影響

1) 血管内皮を剥離した標本の場合

NA の灌流により tension, ratio および current の増加がみられたが, 続いて ACh を追加灌流したところ, tension, ratio および

current のいずれも変化はみられなかった (図 5).

2) 血管内皮を温存した標本の場合

NA の投与により tension, ratio および current の増加がみられた. その後, ACh を投与したところ tension および ratio は急峻な減少を示し, 同時に current は緩徐に増加した (図 6).

ACh を投与中, 各濃度において tension, ratio および NO は経時的な変化を示した. tension は, 各濃度で投与開始直後から抑制され, 3 μ M では 2 分後に基準値の 72.0% (平均値, 以後同様), 30 μ M では 4 分後に 45.4%, 300 μ M では 3 分後に 55.5% まで抑制された. 以後いずれも大きな変化なく経過した. ratio は, 3 μ M では 3 分後に基準値の 47.0%, 30 μ M では 4 分後に 41.7%, 300 μ M では 4 分後に 42.6% まで抑制されたが, 3 μ M と 300 μ M はいずれも 5 分後には 75.0%, 78.2% まで回復し, 以後は, い

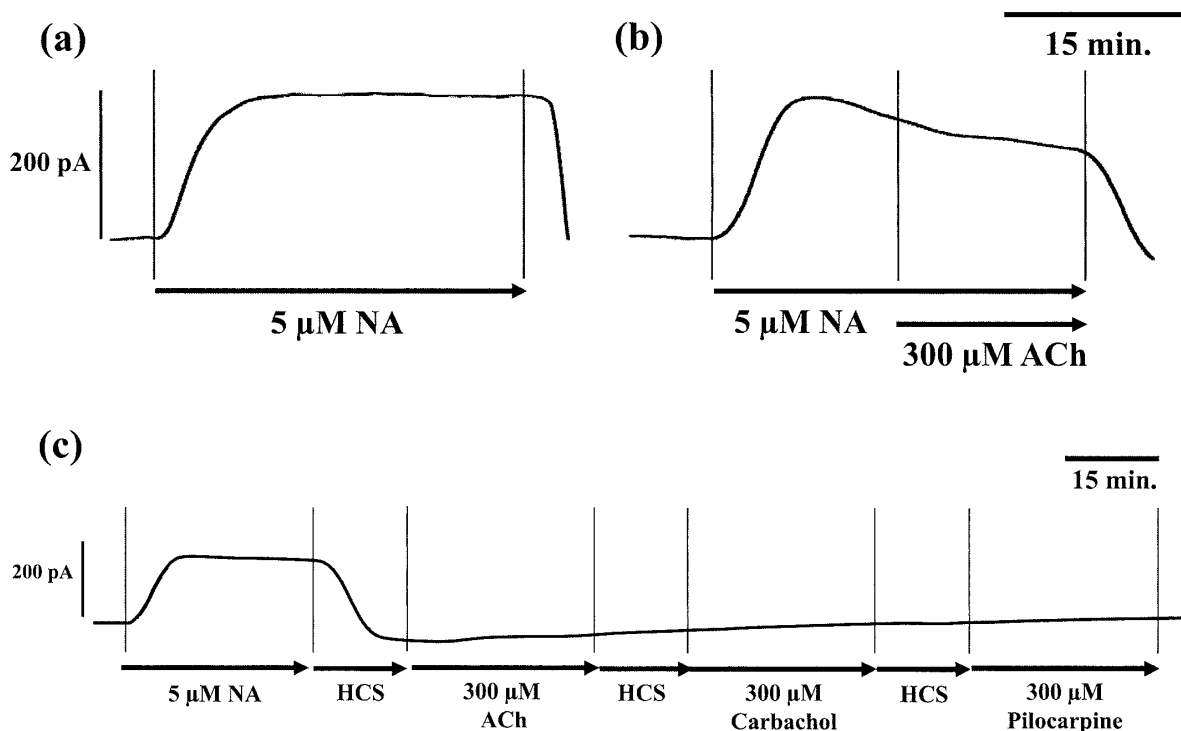


図4 NA および各種血管拡張物質の NO センサーへの影響

(a) 5 μ M NA の灌流により 200 pA 前後の current が発生した。

(b) 5 μ M NA の灌流後, 300 μ M の ACh を灌流しても current に変化がなかった。

(c) 5 μ M NA の灌流に続いて 300 μ M の ACh, Carbachol, Pilocarpine をそれぞれ単独で投与しても current に変化はみられなかった。

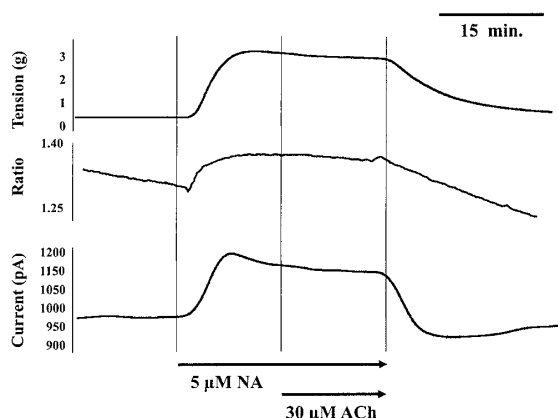


図5 血管内皮を除去した標本における NA および ACh の影響

tension, ratio 及び current は NA の灌流により増加がみられたが, ACh の追加灌流しても増加はみられなかった.

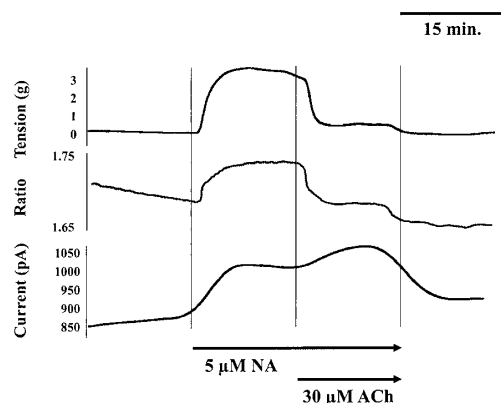


図6 血管内皮を温存した標本における NA および ACh の影響

NA の灌流により tension, ratio および current の増加がみられた. ACh の追加灌流により tension および ratio は急峻な減少を示し, current は緩やかな増加を示した.

ずれも大きな変化はなく経過した. NO は, 3 μM では徐々に増加して 4 分後に 866.0 nM と最高値を示した. 30 μM では 5 分後に 546.7 nM, 300 μM では 7 分後に 779.6 nM と最高値を示した. 以後, 大きな変化はなかった(図 7).

4. 血管内皮のある標本での NA の tension, ratio および current の変化に対する Carbachol, Pilocarpine 投与の影響

1) Carbachol 投与による影響

Carbachol を投与中, tension は 3 μM ではほと

んど抑制されず, 30 μM , 300 μM では 3 分後にそれぞれ 72.7%, 62.7% まで抑制された. その後, 30 μM では徐々に抑制がなくなった. 300 μM では 5 分後には 42.6% まで抑制され, 以後, 大きな変化はなく経過した. ratio は, 3 μM , 30 μM , 300 μM でいずれもほとんど変化はみられなかった. NO は, 3 μM ではほとんど増加しなかった. 30 μM では統計上の有意差はみられなかったが, 徐々に増加し, 8 分後に最高値 (161.7 nM) になり, 以後, 徐々に減少した. 300 μM でも徐々に増加して 10 分後に 231.0 nM を示した(図 8).

2) Pilocarpine 投与による影響

Pilocarpine を投与中, tension は 3 μM ではほとんど抑制されず, 14 分以降に有意な抑制がみられた. 30 μM では徐々に抑制され, 8 分後に 75.8% まで有意に抑制された. 300 μM では 3 分後に 78.0%, 6 分後には 68.0% まで抑制されたものの有意差はなかった. ratio は, 3 μM , 30 μM , 300 μM でいずれも時間とともに抑制された. NO は 3 μM ではほとんど増加しなかった. 30 μM では統計上の有意差はみられなかったが, 徐々に増加し, 4 分後に最高値 (238.8 nM) を示し, 以後, ほぼ横ばいとなった. 300 μM では 3 分後には 267.0 nM まで有意に増加し, 10 分後に最高値 (450.0 nM) を示した(図 9).

5. 用量反応曲線の結果

1) ACh について

tension は 30 μM で 30% 前後まで抑制されたが, 300 μM で回復傾向がみられた. ratio は各群ともに 45% 前後の抑制を示し, tension と同様の変化がみられた. NO は各群ともに 550~900 nM の値を示し, tension と同様の変化がみられた.(図 10).

2) Carbachol について

tension は濃度依存的に抑制傾向を示し, 3 μM と 300 μM で有意差がみられた. ratio は各群とも 80% 前後の抑制を示し, 有意差はみられなかった. NO は濃度依存的に増加する傾向がみられた(図 11).

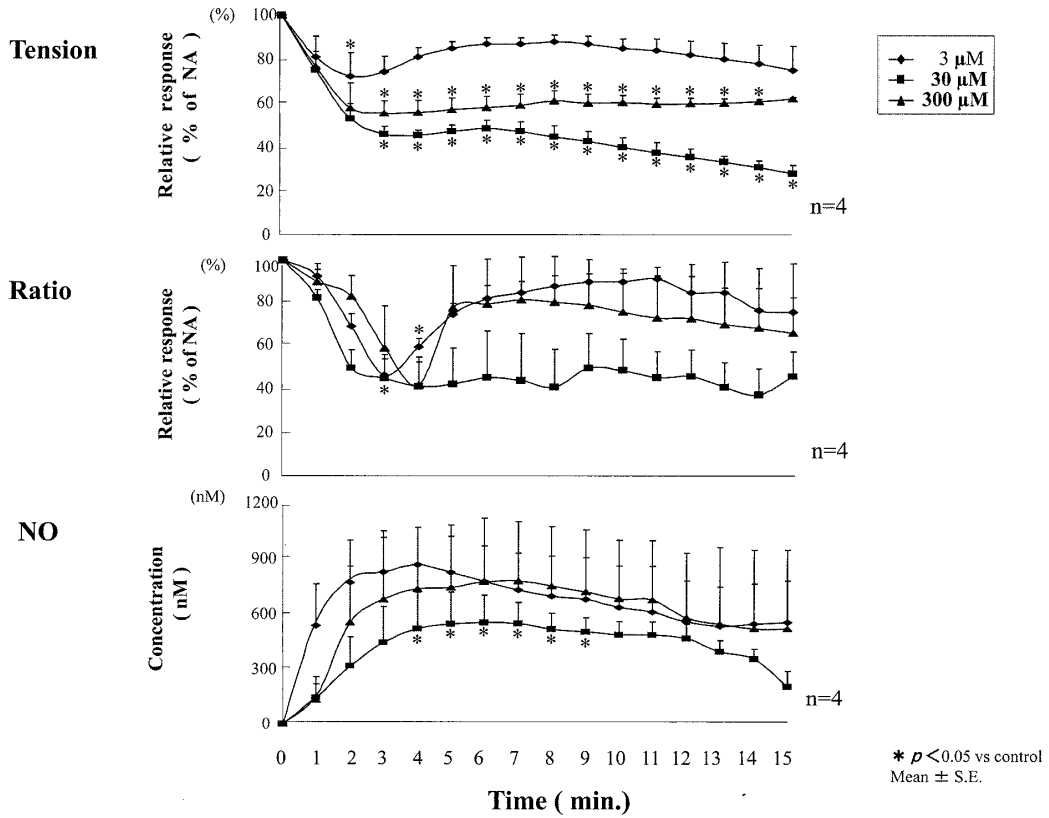


図7 AChにおける経時的変化

はcontrol値に対する有意差を示す。 $p < 0.05$ Mean \pm S.E.

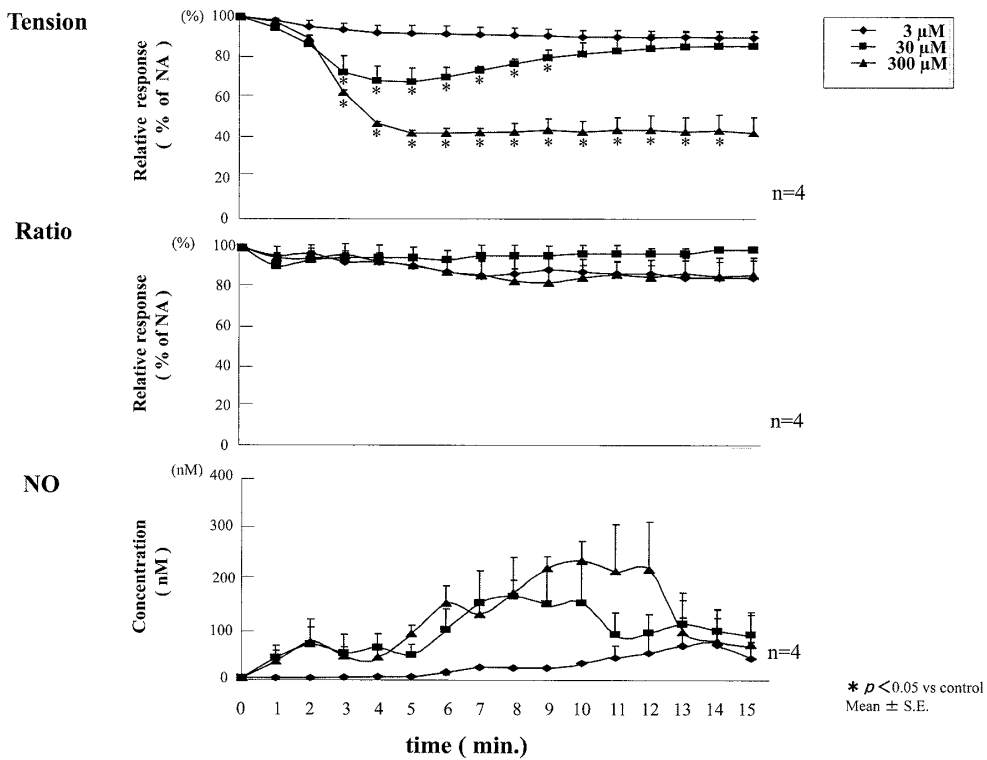


図8 Carbacholにおける経時的変化

はcontrol値に対する有意差を示す。 $p < 0.05$ Mean \pm S.E.

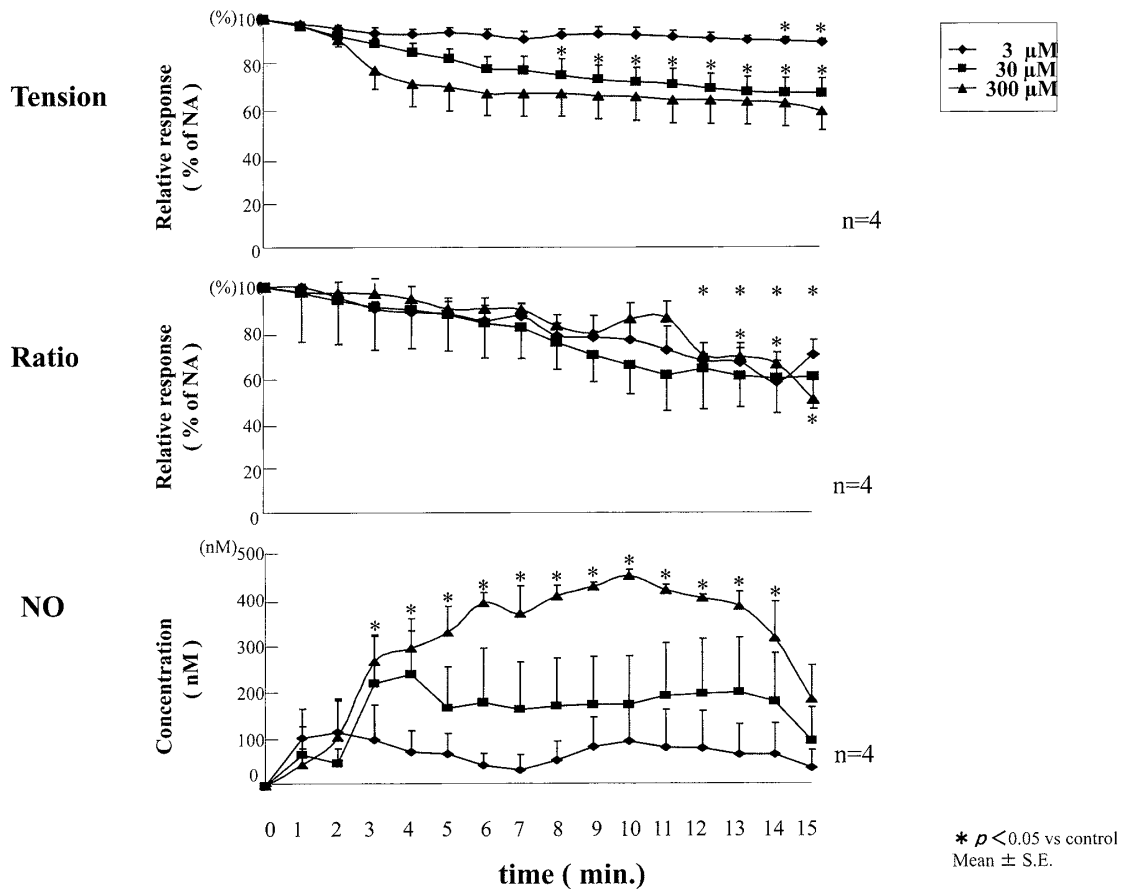


図9 Pilocarpine における経時の変化
*は control 値に対する有意差を示す。 * $p < 0.05$ Mean \pm S.E.

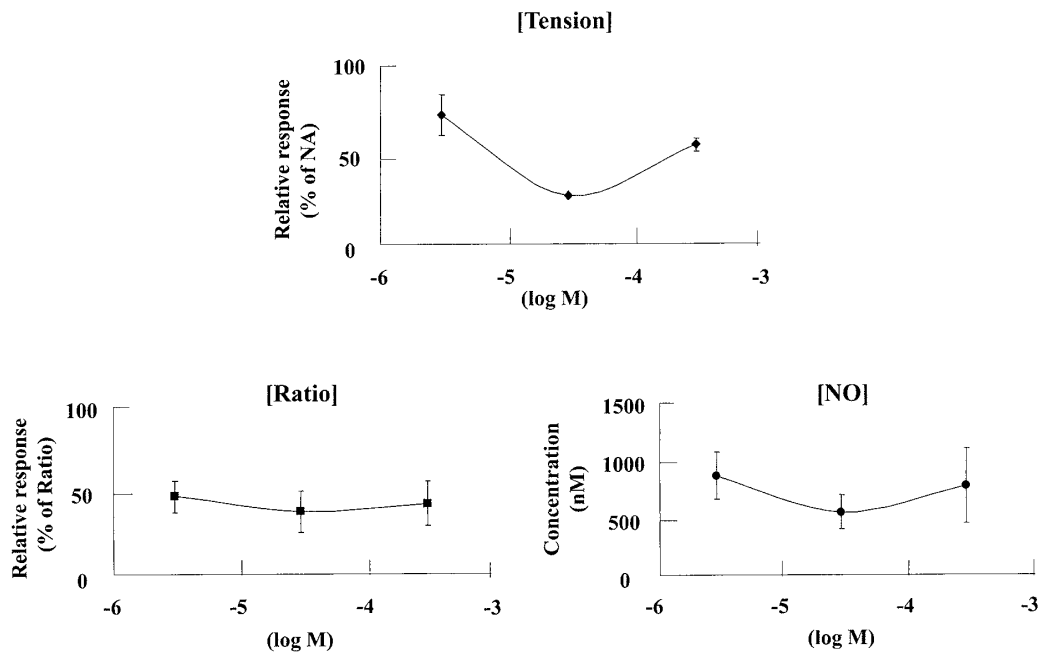


図10 ACh における tension, ratio, NO の用量反応曲線
tension で 30 μ M で抑制傾向がみられ, 300 μ M では回復傾向を示した.

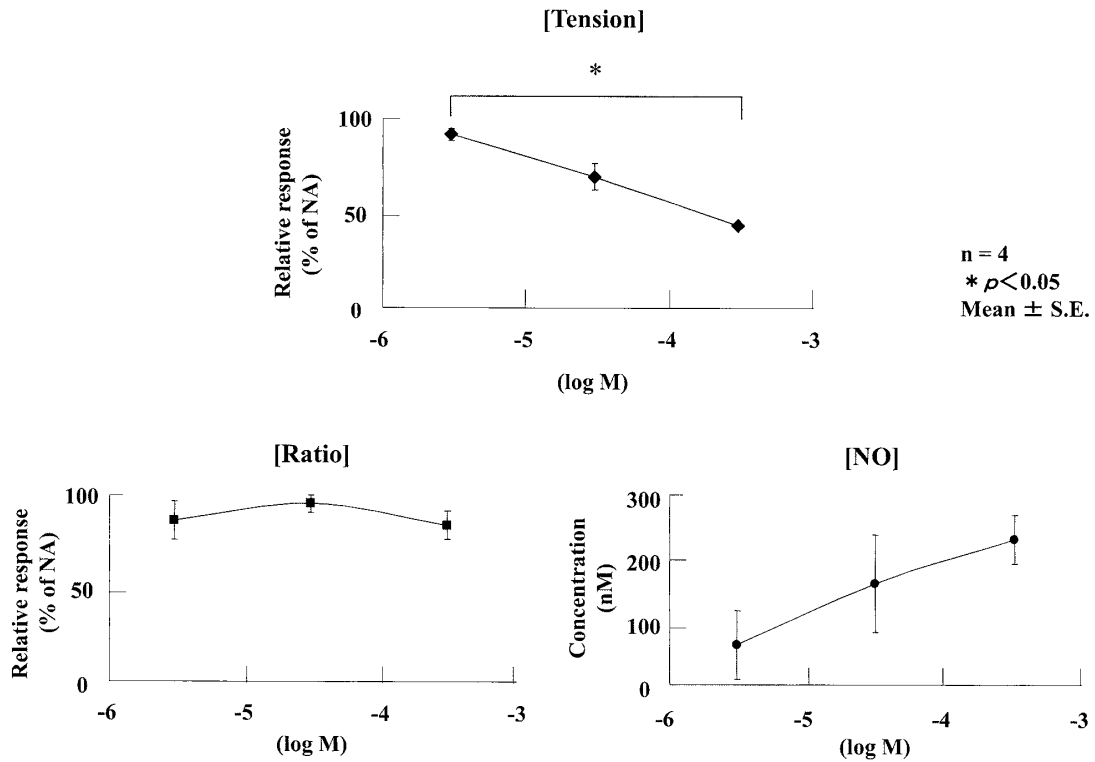


図11 Carbacholにおける tension, ratio, NOの用量反応曲線
tensionで3 μ Mと300 μ Mの間で有意差がみられた。* $p < 0.05$ Mean \pm S.E.

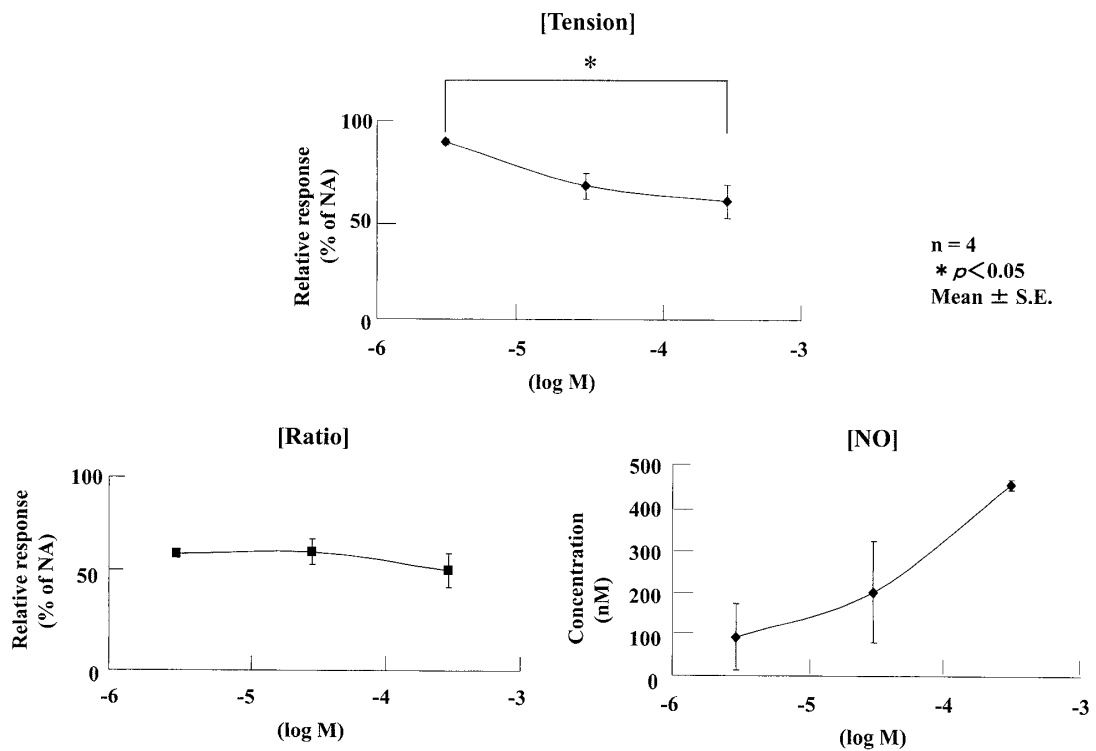


図12 Pilocarpineにおける tension, ratio, NOの用量反応曲線
tensionで3 μ Mと300 μ Mで有意差がみられた。* $p < 0.05$, Mean \pm S.E.

3) Pilocarpine について

tension は濃度依存的に抑制される傾向を示し、3 μM と 300 μM で有意差がみられた。ratio では各群とも約 53% の抑制を示した。NO では濃度依存的に増加する傾向がみられた (図 12)。

6. 重回帰分析の結果

1) ACh について

有意に関連していたのは、NO が多く放出されるほど濃度依存的に収縮が抑制されることと、ACh の濃度が高いほど NO が多く放出されることであった。

2) Carbachol について

有意に関連していたのは、Carbachol の濃度が高いほど NO が多く放出されることであった。

3) Pilocarpine について

有意に関連していたのは、Pilocarpine の濃度が高いほど NO が多く放出されることであった。

考 察

1. NO の直接測定について

これまで NO は、超短時間作動性のガス状の分子で、直接測定することが困難であったため、NO 合成阻害薬による間接的測定法⁷⁾が多くおこなわれていた。近年、NO を電気化学的に測定する方法として電極法が開発され、直接的に測定できるようになった。しかし、電極の位置関係や安定性などから動きのある組織から直接的に測定することはきわめて困難である。さらに、口腔領域の血管を用いて直接的に測定した報告は、我々がはじめてである。

NO の測定法には、電極法の他にオゾン化学発光法、グリース反応法、スピントラップ法 (ヘモグロビン法)、ラジオアイソトープ法など多彩である⁵⁾が、電極法は直接的に NO の計測が可能である^{11~14)}。今回使用した ISO NOP30 電極 (World Precision Instruments) は、ポリマーコーティングされた carbon fiber で、スーパーオキシドなどのイオン性反応種をブロックし、

微量の NO でも比較的安定した測定が可能である^{11,12)}。本研究においても、校正直線を求める実験で、NO 濃度と current の間に高い相関性がみられた。(図 3)。しかし、電極法に共通した問題点として、ある種の薬物を投与した場合、とくにカテコラミン類を投与した場合に電流を感知してしまうことが挙げられており^{9~14)}、その原因も解明されていない。本研究では、5 μM NA の投与によって 200 pA 前後の電流が発生したが、ACh, Carbachol および Pilocarpine の追加投与あるいは単独投与では電流の発生はみられなかった。また本研究は、NA 投与時から血管拡張物質による変化量を測定したものであり、本研究の結果には影響が少ないものと思われた。

NO の半減期は報告によって様々であるが^{15~17)}、今回われわれと同じ ISO NOP30 電極を使用した Simonsen ら¹¹⁾の報告では、約 2 分とされており、NO の拡散と組織の劣化が NO 濃度に影響を与えるのではないかと述べている。また NO 濃度については、Simonsen ら¹¹⁾はラットの上腸間膜動脈では、ACh 投与開始約 2 分後で最高値 21 nM を示したとしている。Zhang ら¹²⁾は、Bradykinin を投与した時の NO 濃度は、ブタ肺動脈では約 4 分後に最大値 160 nM となり、肺静脈では 3 分後に最高値 103 nM となったと報告している。さらに NO 放出持続時間は、肺動脈では約 14 分、肺静脈では約 12 分であったと報告している。その他、NO の放出量については、340 nM~1360 nM と様々であるが^{11,12,18,19)}、用いた電極の性能の違いや標本の作成方法、種差、研究の環境および刺激薬の違いによるものと考えられる。本研究では、最高値は、ACh で 4 分後~7 分後で平均値 546~780 nM、Carbachol で 8 分~13 分後に平均値 65~230 nM、pilocarpine で 10 分後~13 分後で平均値 96~450 nM であった。最高値を示すまでの時間はこれまでの報告より遅いが、値はほぼこれまでの報告の範囲内にあり、妥当なものと思われる。しかし、個体差が大きく、様々な条件がその測定に影響を与えた可能性が

ある。

収縮の抑制と NO 放出量との関係を Simonsen ら¹¹⁾ は, ラットの上腸間膜動脈では 1 μM NA による収縮を 50% 抑制するのに, NO 濃度は 300~400 nM の増加したと報告している。本研究では, 5 μM NA による収縮を 50% 抑制するためには ACh 群では 500~800 nM, Carbachol 群では 200~300 nM, Pilocarpine 群では 500 nM 前後の NO 濃度の増加があったと考えられる。

2. ACh, Carbachol および Pilocarpin による NA の tension, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, NO 濃度への影響について

本研究では血管拡張物質として, ACh, Carbachol および Pilocarpine を用いた。これらはいずれもコリン作動薬で, ACh と Carbachol はコリンエステル類, Pilocarpine はコリン作動性天然アルカロイドである。ACh はムスカリン作用とニコチン作用があり, Carbachol はムスカリン作用とニコチン作用があるが ACh よりもニコチン作用が強く, Pilocarpine はムスカリン作用が強い²⁰⁾。

ACh については, 本研究では NO の経時的变化からみると, 比較的早期に NO が増加し, その後の持続相に続いて次第に減少している。ACh などの受容体刺激薬は, 内皮細胞にある受容体と結合して G 蛋白を介してホスホリパーゼ C を活性化し, イノシトール三リン酸 (IP3) を産生して内皮細胞内の貯蔵部位から Ca^{2+} の放出を促す。この Ca^{2+} が構成型 NO 合成酵素 (cNOS) を活性化して L-アルギニンから EDRF である NO とシトルリンを産生する。NO はただちに平滑筋細胞に取り込まれ, グアニル酸シクラーゼの活性により cGMP がつくられ, G キナーゼが活性化される。その結果, ①細胞情報伝達系 (イノシトールリン脂質代謝回転) の活性を抑制する。② Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルの開口により膜を過分極し, Ca^{2+} チャネルの開口を間接的に抑制する。③ Ca^{2+} ポンプを活性化して Ca^{2+} の細胞外への汲み出しと細胞内貯蔵部位への取り込みを増加する

($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の抑制)。④ミオシンのリン酸化を抑制し, 収縮蛋白質を抑制する (Ca^{2+} 感受性低下), などの機序により血管平滑筋の収縮を抑制する^{5, 21, 22)}。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時的变化では, ACh の 3 μM , 300 μM で一過性の減少がみられ, すぐに回復した。一方, 30 μM では減少したまま推移した。一過性の反応については, NO が内皮細胞自身にも作用して cNOS の L-アルギニンに対する V_{max} を低下させるネガティブフィードバックがかかるとも言われていることから, ^{8, 9)} 本研究の結果はそれによっても考えられる。また EDRF には NO 以外にも, 内皮細胞由来の過分極因子があり, 血管平滑筋の弛緩をもたらすプロスタグランジンやエンドセリンなどが関与する可能性が考えられた。本実験では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を蛍光強度比 (ratio) で示しており, その実測値は計測していないが, 内皮細胞による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化については, ウシ胎仔の大動脈内皮細胞の培養内皮細胞に 10⁻⁸~10⁻⁵ M の ACh を投与すると 30 nM の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加がみられたとの報告がある²³⁾。用量反応曲線においては, NA による tension と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加の抑制は 30 μM で強く, 300 μM で回復する傾向がみられた。NO についても同様の変化がみられた。これら濃度による反応の相違は, ACh はムスカリン作用の他にニコチン作用も有し, 濃度によってその作用の出現が異なると考えられている²⁴⁻²⁶⁾。本研究において tension, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ および NO の経時的变化が類似していることから 3 μM , 300 μM ではニコチン作用が強く現れ, 30 μM ではムスカリン作用が強く現れたのではないかと考えられる。

Carbachol については, 濃度依存的に NO の放出が増加した。経時的にはいくつかのピークを形成しながら徐々に増加する傾向がみられ, 8 分~12 分で最高値を示し, その後減少している。これは ACh や Pilocarpine に比べると最高値を示すのが遅かった。一方, tension は 3 分後には抑制されており, 5 分後には最も抑制されて, 30 μM ではその後回復し, 300 μM で

はその後も抑制が続いた。[Ca²⁺]_iについてはほとんど変化しなかった。Carbachol は内皮細胞の [Ca²⁺]_i を増加させて、その結果 cNOS が活性化されることで NO が遊離し、平滑筋が弛緩するといわれている^{1,8-10)}。本研究では励起光を標本の外側すなわち血管の外膜より照射しているため、その照射深度がどこまで到達しているのかは不明であるが、内皮細胞の [Ca²⁺]_i 増加と NO による平滑筋細胞の [Ca²⁺]_i 抑制が相殺され、[Ca²⁺]_i が見かけ上、変化しなかったものと推察される⁵⁾。用量反応曲線においては、Carbachol は NA による tension を濃度依存的に抑制する傾向を示したが、[Ca²⁺]_i は各濃度ともに抑制はわずかであった。NO は濃度依存的に増加傾向を示した。Carbachol もムスカリン作用とニコチン作用があり、ニコチン作用が強いと考えられているが本研究からはそれぞれの作用が血管拡張にどの程度反映しているかはわからなかった。

Pilocarpine については、濃度依存的に NO が増加した。経時的には投与開始 3 分後の比較的早期から増加がみられ、Carbachol と同様に 300 μM ではいくつかのピークを形成しながら更に増加して 10 分後に最高値を示した。tension と [Ca²⁺]_i では早期には変化がみられず、後半で徐々に抑制される傾向がみられた。Pilocarpine はムスカリン M3 受容体への親和性が高く、血管平滑筋に対し拡張作用を有する。NO が早期から後半にかけて放出されていたが [Ca²⁺]_i の変化が小さかったのは、血管内皮細胞の [Ca²⁺]_i が増加し、NO が放出されたにもかかわらず、収縮抑制機構が強く働かなかったものと推察される。その理由については今後の検討が必要である。用量反応曲線においては、tension は濃度依存的に抑制される傾向がみられ、[Ca²⁺]_i では濃度による変化はみられなかった。NO では濃度依存的に増加傾向を示した。Pilocarpine もムスカリン作用とニコチン作用があり、ムスカリン作用が強いと考えられているが、本研究からはそれぞれの作用が血管拡張にどの程度反映しているかはわからなかつ

た。

本研究では、ブタ舌動脈血管平滑筋では 5 μM の NA による収縮を 50% 抑制するためには ACh 群では 500~800 nM、Carbachol 群では 200~300 nM、Pilocarpine 群では 500 nM 前後の NO 濃度の増加があったと考えられる。しかし本研究では、収縮の抑制程度と NO 濃度の増加との関連性について解明するまでには至っていない。今後さらに検討する必要があると考える。

結 論

ブタ舌動脈血管平滑筋収縮において、NA を投与した際に発生する収縮に対して血管拡張物質 (ACh, Carbachol および Pilocarpine) を追加投与した時の tension, [Ca²⁺]_i, NO の変化を測定した。その結果から以下の結論を得た。

1. 電極法による NO の直接的な測定は、正確であり、経時的な NO の測定に有用である。ただし、特定薬液にたいしての反応を考慮する必要があるなど、今後の課題も残る。
2. ACh では、ACh 濃度が増加するほど NO の放出は減少したが、NO の増加にともない NA の舌動脈血管平滑筋収縮を抑制した。[Ca²⁺]_i は NO の増加とともに抑制される傾向がみられたが、濃度によって異なった変動がみられた。
3. Carbachol では、濃度依存的に NO が放出された。各濃度において [Ca²⁺]_i の変化はほとんどみられなかったが、収縮は有意に抑制された。
4. Pilocarpine では、濃度依存的に NO が放出され、NA による収縮を濃度依存的に抑制する傾向を示した。[Ca²⁺]_i は、各濃度ともにほぼ同程度の抑制を示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御高閲を賜りました城 茂治教授に深甚なる謝意を表します。また、本稿の御高閲を賜りました生理学講座病態生理学分野 佐原 資謹教授な

らびに薬理学講座病態制御学分野 加藤 裕久教授に深い感謝の意を表します。そして温かい御支援、御協力および御助言をいただきました佐藤 雅仁准教授はじめ歯科麻酔学分野医局員各位ならびに口腔生化学講座（現 生化学講座細胞情報科学分野）川口 高樹元講師に心より御礼申し上げます。本研究の一部は第38回日本歯科麻酔学会総会（平成22年10月8日）において発表した。

引用文献

- 1) 佐藤 健一：ブタ舌動脈血管平滑筋におけるアドレナリン収縮機序の検討。日歯麻誌, 25 : 398-409, 1997.
- 2) 佐藤 裕, 久慈 昭慶：ブタ舌動脈における低酸素性肺血管収縮の発現機序に関する検討－特に血管内皮細胞およびNOとの関係について－。岩医大歯誌, 26 : 33-43, 2001
- 3) Shharma, S., Kumar, S., Sud, N., Wiseman, A. D., Tian, J., Rehmani, I., Datar, S., Oishi, P., Fratz, S., Venema, C. R., Fineman, R. J., and Black, M. S.: Alteration in lung arginine metabolism in limbs with pulmonary hypertension associated with increased pulmonary blood flow. *Vascul. Pharmacol.*, 51 : 359-364, 2009.
- 4) Yerebakan, C., Ugurluca, M., Bayraktar, S., Bethea, T. B., and Cote, V. J. : Effects of inhaled nitric oxide following lung transplantation., *J. CARD.SURG.* 24 : 269-274, 2009.
- 5) 唐木英明：NOの血管作用。戸田 昇 編集：NO 生命現象を修飾する細胞間メッセンジャー。第4版, メジカルビュー社, 東京, 108-117 ページ。1998.
- 6) 西 健, 佐藤健一：ブタ舌動脈血管平滑筋に対する炎症性ケミカルメディエーターの影響。岩医大歯誌, 32 : 25-34, 2007.
- 7) Miller, J. F., Dellsperger, C. K., and Gutterman, D. D.: Pharmacologic activation of human coronary microcirculation in vitro: endothelium-dependent dilation and differential response to acetylcholine., *Cardiovasc. Res.* 38 : 744-750, 1998.
- 8) Buus, H. N., Simonsen, U., Pilegaard K. H., and Mulvany J. M.: Nitric Oxide, prostanoid and non-NO, non-prostanoid involvement in acetylcholine relaxation of isolated human small arteries., *Br. J. Pharmacol.* 129 : 184-192, 2000.
- 9) Sugita, Y., Mizuno, S., Nakayama, N., Iwaki, T., Murakami, E., Wang, Z, Endoh, R., and Furuta, H.: Nitric oxide generation directly responds to ultrasound exposure., *Ultrasound Med. Biol.* 34 : 487-493, 2008.
- 10) Ishida, H., Hirota, Y., Higashijima, N., Ishiwata, K., Chokoh, G., Matuyama, S., Murakami, E., and Nakazawa, H.: Direct nitric oxide release from nipradilol in human coronary arterial smooth muscle cell observed with fluorescent NO probe and NO-electrode., *Pathophysiology* 11 : 77-80, 2004.
- 11) Simonsen, U., Wadsworth, M. R., Buus, H. N., and Mulvany, J. M.: In vitro simultaneous measurements of relaxation and nitric oxide concentration in rat superior mesenteric artery., *J. Physiol.* 516 : pp271-282, 1999.
- 12) Zhang, R., Yang, Q., Yim, P.C. A., Huang, Y., and He, G.: Role of NO and EDHF-mediated endothelial function in porcine pulmonary circulation: Comparison between pulmonary artery and vein., *Vasc. Pharmacol.* 44 : 183-191, 2006.
- 13) Takahashi, S., Omori, Y., Miyazaki, H., Yosino, F., Shoji, H., Lee, M., Todoki, K., Kamibayashi, M., Murakami, E.: Real-time monitoring of nitric oxide in ischemic myocardium using an NO-selective electrode calibrated by electron spin resonance., *Life Sci.* 74 : 75-85, 2003.
- 14) Friedman N. M., Robinson, W. S., and Gerhard, A. G.: *o*-Phenylenediamine-Modified Carbon Fiber Electrodes for the Detection of Nitric Oxide., *Anal. Chem.* 68 : 2621-2628, 1996.
- 15) Beckman, J. S., and Koppenol, W. H.: Nitric oxide, superoxide, and proxynitrite: the good, the bad, and the ugly., *Am. J. Phys.* 271 : C1424-1437, 1996.
- 16) Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor., *Nature* 327 : 524-526, 1987.
- 17) Feelisch, M., Poel, M. T., Zamora, R., Deussen, A., and Moncada, S.: Understanding the controversy over the identity of EDRF., *Nature* 368 : 62-65, 1994.
- 18) Cohen, R. A., Plane, F., Najibi, S., Huk, I., Malinski, T., and Garland, C. J.: Nitric oxide is the mediator of both endothelium-dependent relaxation and hyperpolarization of the rabbit carotid artery., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 4193-4198, 1997.
- 19) Tschudi, M. R., Barton, M., Bersinger, N. A., Moreau, P., Cosentino, F., Noll, G., Malinski, T., and Luscher, T. F.: Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery., *J. Clin. Invest.* 98 : 899-905, 1996.
- 20) 野村隆英：自律神経作用薬, 植松俊彦, 野村隆英, 石川直久 編集：シンプル薬理学, 改訂第3版, 南江堂, 東京, 67-91 ページ, 2004.
- 21) Karaki, H., Sato, K., and Ozaki, H.: Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle., *Eur. J. Pharmacol.* 156 : 259-266, 1988
- 22) Yoshida, Y., Sun, H.-T., and Cai, J.-Q.: Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein., *J.*

- Biol. Chem. 266 : 19819-19825, 1991.
- 23) Risa Korenaga., Joji Ando., Akira Othuka., Ichiro Sakuma., Weidong., Teruhiko Toyo-oka., and Akira Kamiya : Close Correlation between Cytoplasmic Ca⁺⁺ Levels and Release of an Endothelium-Derived Relaxing Factor from Cultured Endothelial Cells., *Cell Struct Funct.* 18 : 95-104, 1993.
- 24) Simonsen U., Prieto D., Rivera L., Hernandez M., Mulvany J. M., and Gracia-Sacristan A.: Heterogeneity of muscarinic receptors in lamb isolated coronary resistance arteries., *Br. J. Pharmacol.* 109 : 998-1007, 1993.
- 25) Venugopalan S. C., Moore M. R., Holms P. E., Sedrish A. S., and Koch E. C.: Biphasic responses of equine colonic vessel rings to vasoactive inflammatory mediators., *Journal of Autonomic Pharmacology* 18 : 231-237, 1998.
- 26) Kapilevich V. L., Anfinogenova D.Y., Baskakov B. M., Kovalev V. I., Nosarev V. A., and Medvedev A. M.: Peculiarities of Cholinergic Regulation of Smooth Muscles in Rabbit Pulmonary Arteries., *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 130 : 728-730, 2000.

Changes of nitric oxide (NO) by various vasodilators in vascular smooth muscle of swine lingual artery

Daiji YAMADA, Kenichi SATOH

Division of Dental Anesthesiology, Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Iwate medical University
(Chief : Prof. Shigeharu Joh)

[Received : January 6, 2012 : Accepted : January 17, 2012]

Abstract : The nitric oxide (NO), which is the main subject of the endothelium-derived relaxing-factor (EDRF), bears an important role in maintaining cardiovascular homeostasis. However, we were not able to look for a report of NO on the vessel in oral area.

Then, this research was planned in order to clarify NO action and mechanism on the lingual artery. Change of NO was measured directly using the electrode method by perfusing various vasodepressors (Acetylcholine(ACh), Carbachol, Pilocarpine) after Noradrenaline (NA) to a swine lingual-artery vascular smooth muscle. Changes in isometric contraction and intracellular calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were measured simultaneously, and their relation to NO was investigated.

The following results were obtained;

1. The direct measurement of NO by an electrode method is useful to measure the exact value of NO with time.
2. In Ach, release of NO decreased so that Ach concentration rose, but the lingual-artery vascular smooth muscle contraction by NA was decreased with elevation of NO.
3. In Carbachol, NO increased in concentration dependent manner and the smooth muscle contraction decreased significantly, but most changes of $[Ca^{2+}]_i$ were not seen in each concentration.
4. In Pilocarpine, NO increased in concentration dependent manner. The contraction by NA showed the trend which decreases in concentration dependent manner. $[Ca^{2+}]_i$ showed an almost comparable reduction in each concentration.

Key Words : nitric oxide, vasodilators, swine lingual artery, intracellular calcium concentration, isometric tension