

モルモット灌流心における nicorandil および
cromakalim の冠流量増加作用におよぼす
L-nitroarginine の影響について

新潟大学医学部薬理学教室 (主任: 今井昭一教授)

神 裕 雅

Influence of L-Nitroarginine on Nicorandil- and Cromakalim-Induced
Increases in Coronary Flow in Isolated Guinea Pig Heart

Hiromasa JIN

*Department of Pharmacology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoichi IMAI)*

Possible contribution of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) to nicorandil- and cromakalim-induced coronary vasodilations was studied in isolated guinea pig hearts. Increases in coronary flow induced by nicorandil, cromakalim and adenosine were significantly inhibited by pretreatment with glibenclamide, an antagonist of ATP sensitive K^+ channel, while those by acetylcholine and papaverine were not. Pretreatment with L-nitroarginine (L-NA), an inhibitor of constitutive nitric oxide synthetase, or with methylene blue (MB), an inhibitor of guanylate cyclase, resulted in a significant inhibition of nicorandil-, cromakalim-, acetylcholine- and adenosine-induced increases in coronary flow. Papaverine-induced increase was not affected by pretreatment with L-NA or MB. These results suggest that the release of EDRF from vascular endothelium is responsible in part for coronary vasodilation induced by nicorandil and cromakalim.

Key words: K^+ channel opener, EDRF, L-nitroarginine, coronary vasodilation, isolated guinea pig heart

K^+ チャネル開口薬, 内皮由来拡張因子, L-ニトロアルギニン, 冠血管拡張, モルモット摘出心

Reprint requests to: Hiromasa JIN,
Department of Pharmacology, Niigata
University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部薬理学教室 神 裕 雅

緒 言

カリウムチャンネルオープナーと呼ばれている薬物は血管の平滑筋細胞膜上に存在している ATP 感受性カリウムチャンネルに作用し、膜を過分極させ、その結果として膜の電位依存性カルシウムチャンネルを閉じさせて、細胞外からのカルシウム流入を抑制し¹⁾²⁾、いわゆるカルシウム拮抗薬と類似した作用で血管を弛緩させると考えられている。しかし、KCl で収縮させた摘出血管に対する弛緩作用に関しては、カリウムチャンネルオープナーとカルシウム拮抗薬で違いがあり、カリウムチャンネルオープナーの弛緩作用は、外液の KCl 濃度が高くなると減弱していき、KCl 濃度が 50 mM 以上では、完全に消失してしまうのに対して、カルシウム拮抗薬の作用は、外液カリウム濃度とは無関係である。一方、ノルアドレナリンによる血管収縮に対しては、代表的なカリウムチャンネルオープナーの 1 つである cromakalim の弛緩作用の方が、カルシウム拮抗薬の弛緩作用よりも強い³⁾ など、カリウムチャンネルオープナーの作用には細胞膜の過分極によるカルシウム流入の抑制だけでは説明できない面もある。近年カリウムチャンネルオープナーによる血管の弛緩には平滑筋細胞に対する作用のみでなく内皮細胞に対する作用も関与する可能性のあることが示唆されている⁴⁾⁵⁾。Lückhoff and Busse ら⁶⁾によると、cromakalim は、血管内皮細胞の K⁺ チャンネルを活性化し、細胞内へのカルシウム流入（膜電位によりコントロールされている）を引き起こし、細胞内カルシウム濃度の上昇を介して、EDRF を産生、遊離させる可能性があるという。本研究の目的は、カリウムチャンネルオープナーの冠血管拡張作用に対する EDRF の関与を明らかにする事にある。

実験方法

エーテル麻酔下に、350 g 前後の Hartley 系雄性モルモットの耳介静脈より 1,000 U/kg の割合でヘパリンを投与した。ヘパリン投与 5 分後に心臓を摘出し、あらかじめ冷却してある Krebs-Henseleit 液にて拍動を停止させ、直ちに 37℃ に加温し 95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスを通気した Krebs-Henseleit 液を用い、75 cm の静水圧で大動脈より逆行性に Langendorff 式に灌流した。冠流量は動脈カニューレの直前に装着した電磁血流計用体外式プローブ (FF-030T, 日本光電) を介し電磁血流計 (MFV-1200, 日本光電) を用い測定した。測定パラメータは熱ペン式記録装置 (RECTI HORIZ 8K,

日本電気三栄) 上に記録した。約 40 分間予備灌流を行い標本が安定した後実験を開始した。

Glibenclamide, methyleneblue あるいは L-nitroarginine は所定の濃度になるように栄養液に溶かし薬物を含まない normal 栄養液と置換し作用させた。薬物 (10 μl) は 5 ~ 10 分間の間隔で電磁血流計プローブの直前より投与した。Glibenclamide, methyleneblue あるいは L-nitroarginine で処置をした場合は、処置 30 分後から投与した。使用した灌流液の組成は以下の通りである。

NaCl 118.0 mM, KCl 4.7 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NaHCO₃ 25.0 mM, glucose 5.5 mM, pyruvate 2.0 mM

使用薬物

L-nitroarginine (Sigma), cromakalim (Sigma), glibenclamide (Sigma), papaverine (Sigma), bradykinin (ペプチド研究所), acetylcholine (第一製薬), adenosine (Sigma), methylene blue (和光純薬), nicorandil (中外製薬)

統計解析

すべての数値は、平均値 ± 標準誤差で表し、群間の有意差検定は Student test を用いて行い p < 0.05 を有意と判定した。

結 果

1. モルモット摘出灌流心に対する acetylcholine および adenosine の作用

モルモット摘出灌流心、冠血管の反応性について検討するため acetylcholine (0.03-1 nmole) および adenosine (0.3-10 nmole) を投与した。いずれの物質も、冠流量を用量依存的に、一過性に増加させた。図 1 にその用量-反応曲線を示す。今回用いた最高用量 (1 nmole) で acetylcholine は、5 例全例で、約 10 秒間続く心拍停止を引き起こした。そのとき冠流量は basal の約 3 倍まで増加していた。一方、adenosine では、最高用量 (10 nmole) で一過性の徐脈が認められたものの、心拍の停止は認められなかった。冠流量は 2.6 倍まで増加した。

2. モルモット摘出灌流心に対する nicorandil, cromakalim の作用

Nicorandil (3-300 nmole) および cromakalim (0.3-10 nmole) は、いずれも用量依存的に、一過性の冠流量増加を起こした。図 2 は、これら薬物による冠流量増加の、用量-反応曲線である。nicorandil および

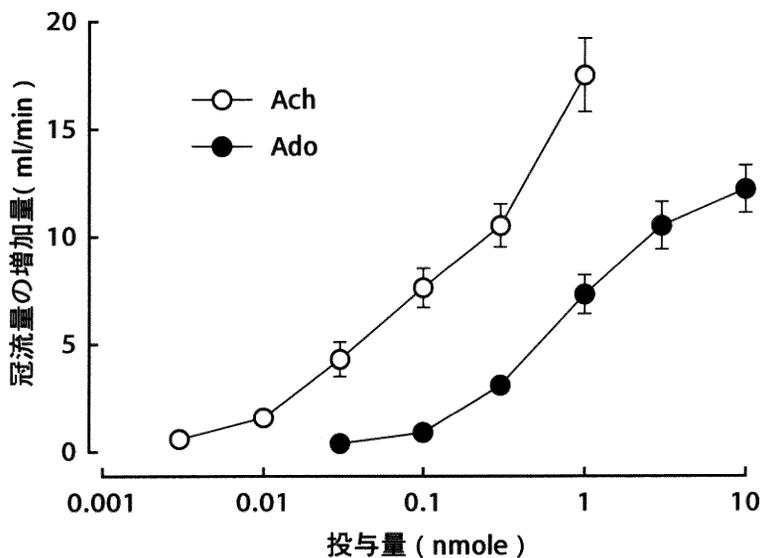


図1 モルモット摘出灌流心における acetylcholine (Ach) および adenosine (Ado) の用量—作用曲線
 平均値±標準誤差 (n=5)

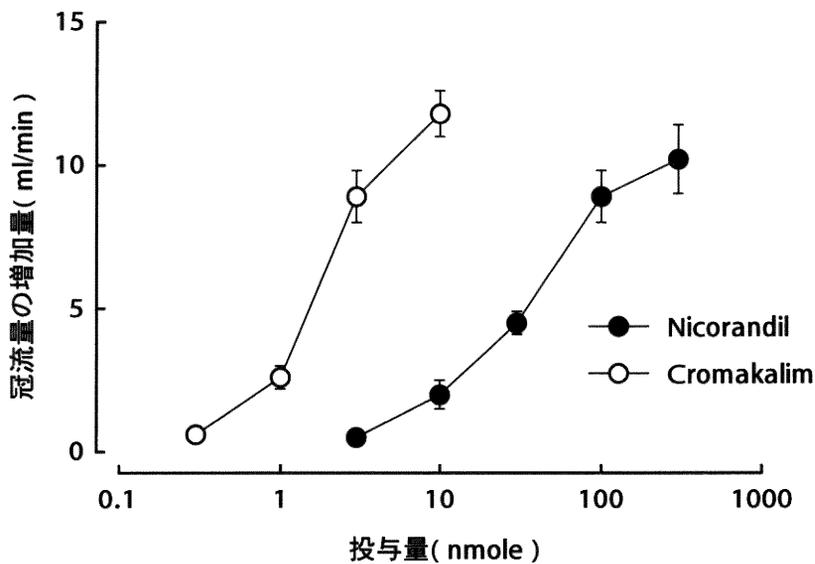


図2 モルモット摘出灌流心における nicorandil および cromakalim の用量—作用曲線
 平均値±標準誤差 (n=5)

cromakalim の最高用量で冠流量は、basal のそれぞれ 2.2 倍および 2.4 倍まで増加した。この用量では、何れの薬物も、心拍数に、ほとんど影響を及ぼさなかった。

3. Acetylcholine, adenosine, nicorandil, cromakalim および papaverine による冠流量増間におよぼす glibenclamide の影響

Glibenclamide 2 μ M 処置後、冠流量は時間とともに、最初は、わずかに減少し、その後増加していった。処置前の 7.1 \pm 0.4 ml/min に対し、処置後30分の時点の流量は、9.3 \pm 1.0 ml/min とわずかに増加していた。glibenclamide を30分間作用させた後、前の実験で心拍数にほとんど影響をおよぼさない事のできた用量の acetylcholine, adenosine, nicorandil および cromakalim を用い glibenclamide の効果につき検討した。比較のため、予備実験で心機能にほとんど影響をおよぼさない事のできた量 (30 nmole) の papaverine でも同様の検討を行った。

図 3 に示すように、nicorandil, cromakalim, adenosine による冠流量増加は、glibenclamide によって有意に抑制された。cromakalim では、抑制は、ほぼ完全であった。これに反し、acetylcholine および papaverine の反応は、glibenclamide で影響されなかった。

4. acetylcholine および bradykinin の冠流量増加におよぼす L-nitroarginine の影響

L-nitroarginine の 100 μ M 処置により、モルモット摘出灌流心の冠流量は徐々に減少して行き処置前の 9.1 \pm 0.5 ml/min に対し、処置30分後の値は、7.5 \pm 0.4 ml/min であった。

血管内皮から EDRF を遊離させる事のできている acetylcholine および bradykinin による冠流量増加は、L-nitroarginine 処置により有意に抑制された (図 4)。

5. adenosine, nicorandil, cromakalim および papaverine の冠流量増加作用におよぼす L-nitroarginine の影響

図 5 に示すように acetylcholine による増加と同じ様に、adenosine, nicorandil, cromakalim による冠流量増加も、L-nitroarginine の 100 μ M 処置により有意に抑制された。一方、papaverine による流量増加は、ほとんど抑制されなかった。

図 6 に、L-nitroarginine 100 μ M 存在下の、cromakalim の用量-反応曲線を示す。L-nitroarginine 100 μ M は cromakalim の用量-反応曲線を右方へ移動させた。

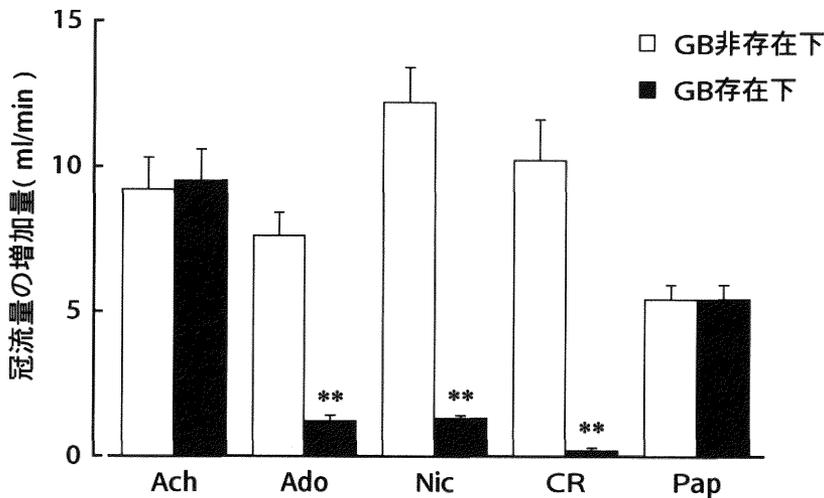


図 3 モルモット摘出灌流心における acetylcholine (Ach), adenosine (Ado), nicorandil (Nic), cromakalim (CR) および papaverine (Pap) の冠流量増加作用に対する glibenclamide の作用
平均値 \pm 標準誤差 (n=5-6)
Ach : 0.3 nmole, Ado : 1 nmole, Nic : 100 nmole, CR : 3 nmole, Pap : 30 nmole, GB : 2 μ M
(**p < 0.01 vs GB 非存在下)

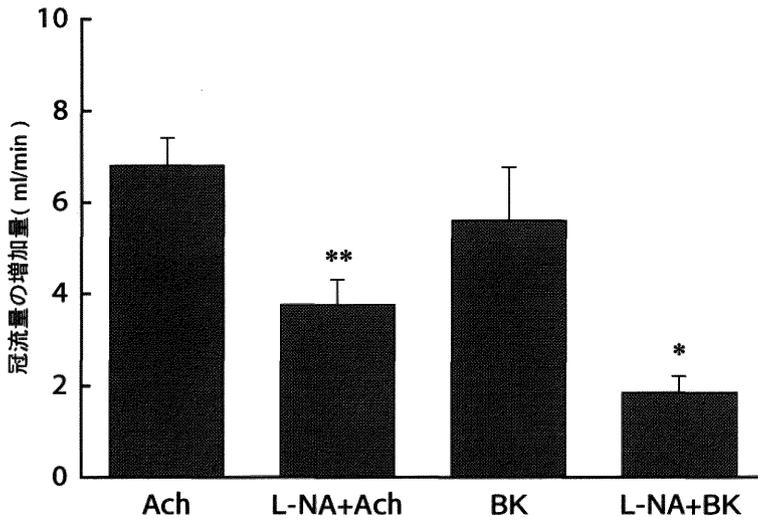


図4 モルモット摘出灌流心における acetylcholine (Ach) および bradykinin (BK) の冠流量増加作用におよぼす L-nitroarginine (L-NA) の影響

平均値±標準誤差 (n=5)

Ach : 0.1 nmole, BK : 0.01 nmole, L-NA : 100 μ M

(**p<0.01, *p<0.05 vs L-NA 非存在下)

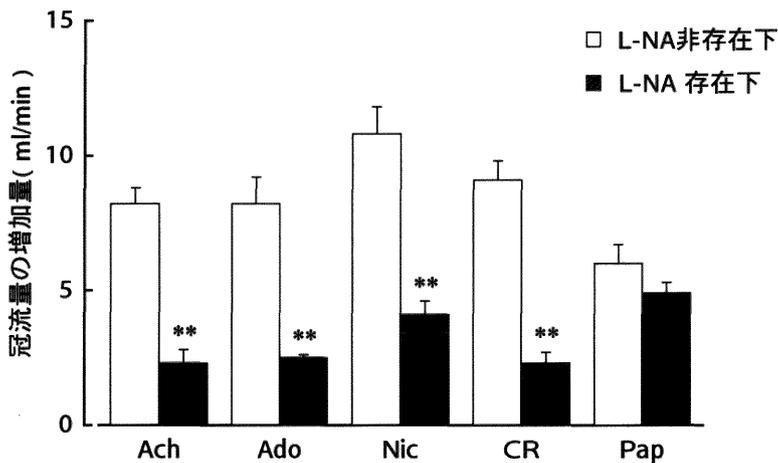


図5 モルモット摘出灌流心における acetylcholine (Ach), adenosine (Ado), nicorandil (Nic), cromakalim (CR) および papaverine (Pap) の冠流量増加作用におよぼす L-nitroarginine (L-NA) の影響

平均値±標準誤差 (n=6-10)

Ach : 0.3 nmole, Ado : 1 nmole, Nic : 100 nmole, CR : 3 nmole, Pap : 30 nmole, L-NA : 100 μ M

(**p<0.01 vs L-NA 非存在下)

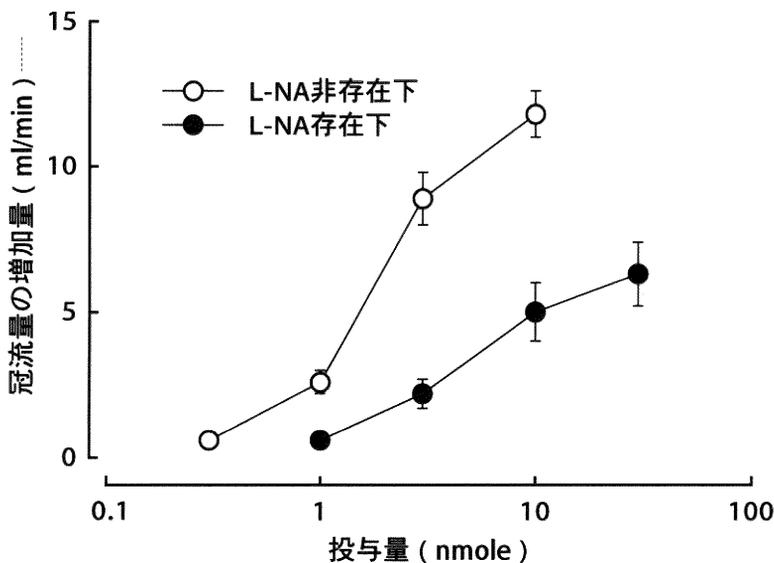


図 6 モルモット摘出灌流心における cromakalim の用量-作用曲線におよぼす L-nitroarginine (L-NA) の影響
平均値±標準誤差 (n=5)
L-NA: 100 μ M

6. acetylcholine, adenosine, nicorandil, cromakalim および papaverine の冠流量増加作用におよぼす methylene blue の影響

摘出血管を用いる実験で一般的に用いられている methylene blue の濃度は 10 μ M であるが、予備実験でその濃度を用いた所、methylene blue だけで冠流量の著しい増加が起り、血管拡張薬を適用しても、それ以上の流量増加は見られぬ事がわかったので、この実験では冠流量に対する作用が最小限である methylene blue 2 μ M を用いた。

methylene blue 2 μ M の処置により、glibenclamide 処理の場合と同様、冠流量は、減少後、徐々に増加のパターンを示した。

図 7 に acetylcholine, adenosine, nicorandil, cromakalim および papaverine による冠流量増加に対する methylene blue の影響を示した。L-nitroarginine 処置と同様、acetylcholine, adenosine, nicorandil および cromakalim による冠流量増加は、methylene blue によって有意に抑制された。papaverine の反応も抑制される傾向を示したが、変化は有意ではなかった。

考 察

本研究で、nicorandil, cromakalim のみならず、adenosine による冠流量増加も、glibenclamide で抑制されたが、adenosine による血管拡張が、ATP 感受性カリウムチャンネルを介した反応であり、glibenclamide によって抑制される事については幾つかの報告⁷⁾⁻⁹⁾がある。

nicorandil, cromakalim および adenosine による冠流量増加は、methylene blue によっても抑制された。周知のように、methylene blue は、guanylate cyclase を阻害し、細胞内 cGMP の上昇を抑制することによって作用する薬物であり、nicorandil, cromakalim および adenosine による冠流量増加が、methylene blue によって抑制された事は、これらの薬物が直接 guanylate cyclase を活性化し、cGMP を増加させて冠流量増加を起こした可能性を示唆するものである。しかし、これらの薬物による冠流量増加は、L-nitroarginine 前処置によっても有意に抑制された事を考えると、血管内皮細胞からの EDRF 遊離を考える方が良さそうである。EDRF は、現在、NO であると考えられており¹⁰⁾¹¹⁾、血管内皮細胞から遊離された上で、平滑筋細胞の guanylate

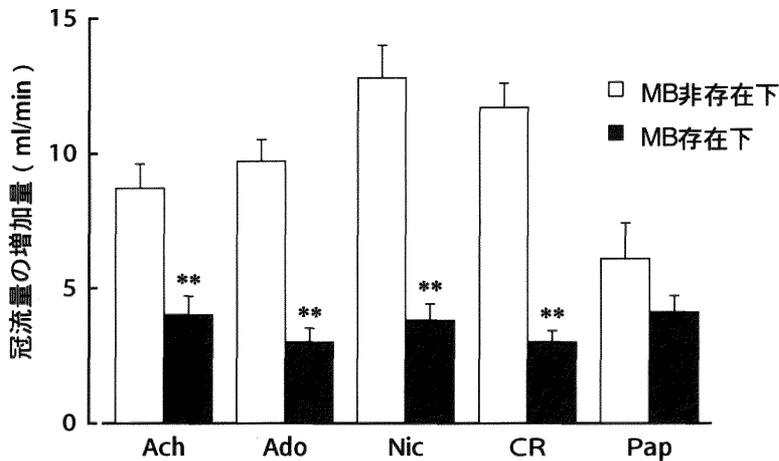


図7 モルモット摘出灌流心における acetylcholine (Ach), adenosine (Ado), nicorandil (Nic), cromakalim (CR) および papaverine (Pap) の冠流量増加作用におよぼす methyleneblue (MB) の影響

平均値±標準誤差 (n=5)

Ach : 0.3 nmole, Ado : 1 nmole, Nic : 100 nmole, CR : 3 nmole, Pap : 30 nmole, MB : 2 μ M

(**p<0.01 vs MB 非存在下)

cyclase を活性化し細胞内の cGMP 濃度を上昇させる。EDRF=NO の遊離を起こす薬物なら、methylene blue による抑制は当然であろう。

これら薬物による EDRF 遊離の機序としては、1) 直接内皮細胞に作用して遊離を引き起こす、2) 内皮細胞のカリウムチャンネルを開かせ EDRF を遊離させる、の2つが考えられるが、L-nitroarginine (および methylene blue) による抑制よりも glibenclamide による抑制が強力であったことを考えると、2) の可能性が高いと思われる。近年、カリウムチャンネルオープナーの作用に血管内皮細胞が関与する事が、指摘されている⁴⁾⁵⁾、Lückhoff and Busse ら⁶⁾によれば、カリウムチャンネルオープナーは、血管内皮細胞のカリウムチャンネルを活性化し、膜を過分極させて内皮細胞への Ca^{2+} 流入 (膜電位によりコントロールされている) を引き起こし、その結果起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を介して、EDRF 産生、遊離を起こす可能性があるという。

EDRF が、acetylcholine や bradykinin などの刺激により血管内皮細胞から遊離され血管を弛緩させることは、よく知られているが、Kostic and Schrader ら¹²⁾ および Jones and Brody ら¹³⁾ はモルモットおよびラット摘出灌流心に EDRF の合成酵素阻害薬である L-ni-

troarginine を作用させると冠流量が減少することから臓器循環の調節物質としての役割も担っていると考えている。今回の研究で、L-nitroarginine の 100 μ M 処置により basal 冠流量の減少が見られたことは、彼らの考えを支持するものである。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤な御指導と共に細部にわたり御校閲を賜りました恩師 今井昭一教授に深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、御助言、御協力を頂きました仲澤幹雄助教授ならびに薬理学教室の方々に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Hamilton, T.C., Weir, S.W. and Weston, A.H.: Comparison of the effects of BRL 34915 and verapamil on electrical and mechanical activity in rat portal vein. Br. J. Pharmacol., 88: 103~111, 1986.
- 2) Cook, N.S., Weir, S.W. and Danzeisen, M.C.: Antivasoconstrictor effects of the K^+ channel opener cromakalim on the rabbit aorta-comparison

- with the calcium antagonist isradipine. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 741~752, 1988.
- 3) **Bray, K.M., Weston, A.H., Duty, S., Newgreen, D.T., Longmore, J., Edwards, G. and Brown, T.J.**: Differences between the effects of cromakalim and nifedipine on agonist-induced responses in rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.*, **102**: 337~344, 1991.
 - 4) **la Rochelle, C.D., Richard, V., Dubois Rande, J.L., Roupie, E., Giudicelli, J.F., Hittinger, L. and Berdeaux, A.**: Potassium channel openers dilate large epicardial coronary arteries in conscious dogs by an indirect endothelium-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**: 1091~1096, 1992.
 - 5) **Lückhoff, A. and Busse, R.**: Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Arch.*, **416**: 305~311, 1989.
 - 6) **Lückhoff, A. and Busse, R.**: Activators of potassium channels enhance calcium influx into endothelial cells as a consequence of potassium currents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch pharmacol.*, **342**: 94~99, 1990.
 - 7) **Belloni, F.L. and Hintze, T.H.**: Glibenclamide attenuates adenosine-induced bradycardia and coronary vasodilatation. *Am. J. Physiol.*, **261** (Heart Circ. Physiol. 30): H720~H727, 1991.
 - 8) **Nakhostine, N. and Lamontagne, D.**: Adenosine contributes to hypoxia-induced vasodilation through ATP-sensitive K⁺ channel activation. *Am. J. Physiol.*, **265** (Heart Circ. Physiol. 34): H1289~H1293, 1993.
 - 9) **Smits, P., Williams, S.B., Lipson, D.E., Banitt, P., Rongen, G.A. and Creager, M.A.**: Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans. *Circulation.*, **92**: 2135~2141, 1995.
 - 10) **Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G.**: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9265~9269, 1987.
 - 11) **Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G. and Moncada, S.**: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**: 524~526, 1987.
 - 12) **Kostic, M.M. and Schrader, J.**: Role of nitric oxide in reactive hyperemia of the guinea pig heart. *Circ. Res.*, **70**: 208~212, 1992.
 - 13) **Jones, L.F. and Brody, M.J.**: Coronary blood flow in rats is dependent on the release of vascular nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**: 627~631, 1991.

(平成9年1月16日受付)