

NO-forming vasodilators と atriopeptin による 血管平滑筋の弛緩と cyclic GMP 増加に対する methylene blue の効果について

新潟大学医学部薬理学教室 (主任: 今井昭一教授)

捧 博 輝

Effects of Methylene Blue on the Relaxation and Increases in Cyclic GMP
Concentrations of Vascular Smooth Muscle Produced by
NO-forming Vasodilators and Atriopeptin

Hiroki SASAGE

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

In the isolated endothelium-removed rabbit aorta (RA) precontracted with phenylephrine, 15 min treatment with methylene blue (15 min-MB) resulted in a rightward shift of the dose-response curve (DRC) for nitroglycerin (NTG) and nitric oxide (NO), while DRC for NaNO₂, sodium nitroprusside (SNP) and atriopeptin (ANP) was not affected. DRC for SNP was not affected in the dog coronary artery (DCA) (endothelium-removed and precontracted with KCl), while DRC for SNP was shifted to the right in the rat and guinea pig aorta. The relaxation by SNP or NaNO₂ was attenuated after 60 min-MB in RA but not in DCA. The relaxation by ANP was not affected after 60-min MB. While increases in tissue cyclic GMP in RA by NTG and NO were attenuated after 15 min-MB, the increases by SNP, NaNO₂ and ANP were not affected even after 60 min-MB. The relaxant effects of 8-Br cyclic GMP were not attenuated after 60 min-MB. Thus, the inhibition by MB of relaxation by SNP and NaNO₂ was due to its action on a process or processes operative before and/or in parallel with the accumulation of cyclic GMP. Species differences in the penetrability of MB were suggested.

Key words: vascular smooth muscle, NO-forming vasodilators, atriopeptin, methylene blue, cyclic GMP
血管平滑筋, NO-forming vasodilators, 心房性ナトリウム利尿ホルモン, メチレンブルー, サイクリック GMP

Reprint requests to: Shoichi IMAI,
Department of Pharmacology, Niigata
University School of Medicine,
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 今井昭一

緒 言

nitroglycerin (以下 NTG と略す), sodium nitroprusside (以下 SNP と略す), NaNO_2 は soluble guanylate cyclase (以下 GC と略す) を活性化する事により組織内の cyclic GMP (以下 cGMP と略す) を増加させる¹⁾²⁾. L-arginine から合成され, endothelium-derived relaxing factor (以下 EDRF と略す) の一つと考えられている nitric oxide (以下 NO と略す) も GC を活性化し, cGMP を増加させる³⁾⁴⁾.

Ignarro ら⁵⁾ は nitrites と有機の nitrates とが GC を活性化する機序に関し, それらが NO または nitrosothiol に変換されてから, GC を活性化させるという考えを提出した. NO や nitrosothiol による soluble GC の活性化は methylene blue (以下 MB と略す) で, 阻害される事が知られているが, NaNO_2 と SNP の弛緩作用については, それが MB により阻害されるかどうかについて, 見解の一致が得られていない. Ignarro ら⁵⁾ は SNP と NaNO_2 によるウシ冠動脈の弛緩と cGMP の蓄積が MB (10^{-5} M) により阻害されたと報告したが, Kreye⁶⁾ はウサギ大動脈では阻害が見られなかったと報告している. 最近 Romanin と Kukovetz⁷⁾ は, 有機の nitrates が nitrites を介して NO に変換されるという仮説に疑いを投げかけている. このような状況の下に, 今回, これらの血管作動物質による血管の弛緩と cGMP 増加に対する, MB の阻害作用について, 動物種による差も含めて検討を行った.

方 法

実験動物には, オス日本白色種ウサギ (体重 2.5~3 kg), オス Wistar 系ラット (体重 200~300 g), 雌雄雑種イヌ (体重 8~12 kg) を用いた. MB による catecholamine の放出によって起こる血管収縮を避けるために⁸⁾, ウサギは血管摘出の18~24時間前にレセルピン処理をした (2 mg/kg, 腹腔内投与). ウサギは pentobarbital sodium の静注 (60 mg/kg) により麻酔し, ラットとモルモットは diethylether 吸入により麻酔した後, 頸動脈を切断して失血死させた. 胸部大動脈を摘出し, 脂肪と結合織を取り除いた後, 内膜面をステンレス棒で摩擦して内皮細胞を剝離せしめた. イヌは thiopental sodium (35 mg/kg) の静注により麻酔した後, 冠動脈を摘出し, 内皮細胞を同様の方法で剝離した. 動物は当大学の動物実験に関する規定に従って取り扱った. 摘出した大動脈, また冠動脈は約 2 mm の幅に切り, 等尺

性収縮を記録するために 10 ml のマグナス管中に 0.5~1 g の静止張力をかけて懸垂し, 60~90分間, 栄養液を繰り返し取り替え安定させた. 栄養液には 37 ± 0.1 度に保温した Krebs-Henseleit 溶液 (NaCl 118 mMol, KCl 4.7, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, MgSO_4 1.2, ブドウ糖 11) を用い, 95% O_2 + 5% CO_2 の混合ガスを十分に通気した. 特に断りのない限り, 以下の実験では, 標本を 10^{-7} M の phenylephrine (以下 Phe と略す) で収縮させた上で, 弛緩薬を累積的に投与した. 等尺性収縮は歪トランスジューサー (東洋ポールドウイン T7-30-24), ストレインアンプ (日本電気三栄 6M81) にて測定した. すべての測定は, レコーダー (日立 056) にて記録した.

NO 溶液の作成

NO 溶液は鹿野ら⁹⁾ の方法に従い, 使用の直前に作成した. 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 の緩衝液 1 ml をゴム栓にて密栓したガラス試験管 (容量約 6 ml) に入れ, 室温で20分間, 真空にて脱気した後, 氷上で20分間, 窒素ガスを流し込んで flush した上で NO ガス (99.8%; 製鉄化学) 50 ml で試験管内の気相を満たした. 試験管を vortex にかけて, 20分間, 水中に静置した後, 窒素ガスを20分間, 流し込んで気相の NO ガスを除去した. NO の水に対する溶解度は 0°C で $7.34 \text{ cm}^3/100 \text{ ml}$ であるから, 溶液中の NO 濃度は約 3.3 mM と仮定した. NO 飽和緩衝液を, 脱気した緩衝液より使用の直前に 10,000 倍に希釈し, その 100 μl をマグナス管中に添加した.

cyclic GMP の測定

摘出した大動脈は張力をかけずに上記と同様な方法で, 95% O_2 + 5% CO_2 の混合ガスを十分に通気した 10 ml の栄養液中に 120 分間置いた上で, 薬物を加え, 一定時間後に液体窒素にて凍結させた. 凍結させた標本は測定の時まで -80°C に保存した. 凍結標本には 1 ml の塩酸 (0.1 M) を加え, Polytron PT10 (Kinematica PT 10/35) でホモジェナイズし, ホモジェネートを 100°C で 3 分間加熱した後, 遠心分離 (4,000 rpm, 30分) して得られた上清を測定に用いた. 測定には cyclic GMP アッセイキット (ヤマサ醤油) を用いた. 塩酸抽出物中の蛋白定量には Lowry 法の変法¹⁰⁾ を用いた.

使用薬剤

nitroglycerin (日本化薬), prazosin (ファイザー製薬), sodium nitroprusside, methylene blue, sodium nitrite (和光純薬), phenylephrine (興和), reserpine (第一製薬), atropine II, 8-Br cyclic GMP (Sigma)

を使用した。

統計解析

すべての数値は、平均値±標準誤差で表した。グループ間の統計処理には、Scheffe の方法による一元配置の分散分析を用いた。2のグループ間、あるいは1つのグループの中では Student の t 検定を用いた。危険率0.05以下を有意の差とした。

結果

ウサギ大動脈とイヌ冠動脈に対する MB 15分処理の阻害効果について

図1に Phe で収縮させたウサギ大動脈リング標本の、NTG と NO による弛緩に対する MB の阻害効果を示す。Acetylcholine (10^{-7} M) で弛緩しない事によりリング標本の内皮細胞を機能的に破壊した事を確認した。MB (10^{-5} M) は15分間のインキュベーションでは、動脈の収縮を殆んど起こさなかったが、NTG, NO による用量-反応曲線を右方に移動せしめた。

図2には NaNO_2 , SNP, atriopeptin II による弛緩に対する MB の効果を示す。MB (10^{-5} M) はこれらの弛緩薬による用量-反応曲線にほとんど作用がなかったが NaNO_2 と atriopeptin II の最高濃度の部分の弛緩は僅かであるが有意に抑制された。

図3はイヌ冠動脈の NTG と SNP による弛緩とそれらに対する MB の効果を示す。イヌ冠動脈は Phe では収縮しないため、この実験ではリング標本は 100 mM KCl により収縮させた。また、MB による catecholamine の放出によって起こる収縮を避けるため、MB を加える1時間前に prazosin (10^{-8} M) を投与した。リング標本の内皮細胞を機能的に破壊した事は acetylcholine (10^{-7} M) で弛緩しない事により確認した。NTG と SNP は、リング標本を用量依存性に弛緩させた。NTG の用量-反応曲線は、ウサギ大動脈の場合と同様に MB (10^{-5} M) の15分間の処理により、著明な右方移動を示したが、SNP の用量-反応曲線は、右方移動しなかった。

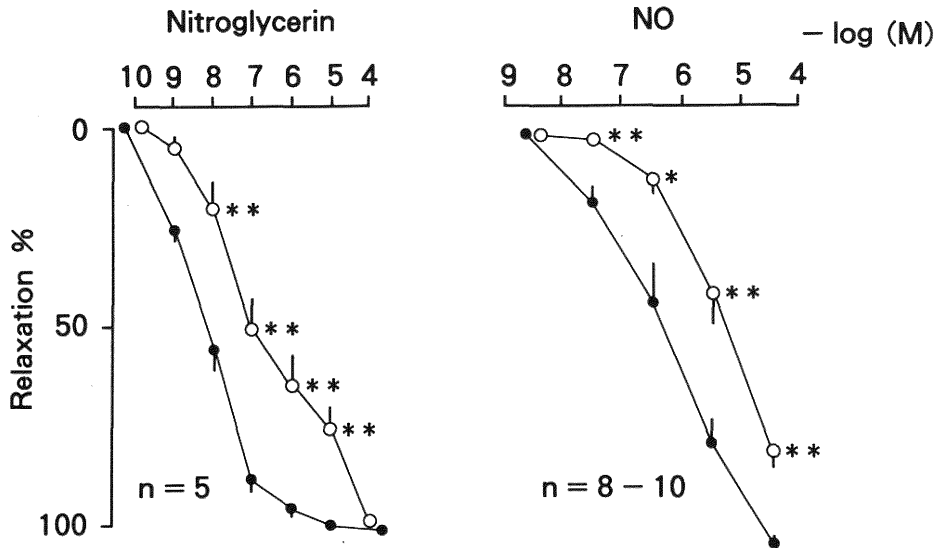


図1 内皮細胞を剥離し、phenylephrine (Phe) で収縮させたウサギ大動脈標本の nitroglycerin (NTG) と nitric oxide (NO) による弛緩に対する methylene blue (MB) 前処理の効果。 10^{-5} M MB で15分間処理の前 (●) と後 (○) に弛緩薬を累積的に投与したときの用量-作用曲線。弛緩は 10^{-7} M Phe の収縮に対する%で表し、薬物の濃度はすべてマグナス管中の濃度で表した。5~10羽のウサギから摘出した5~10個の大動脈標本から得られた値の平均値±標準誤差。MB 存在下の値と、MB 非存在下の値には何れの薬物でも有意の差があった (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

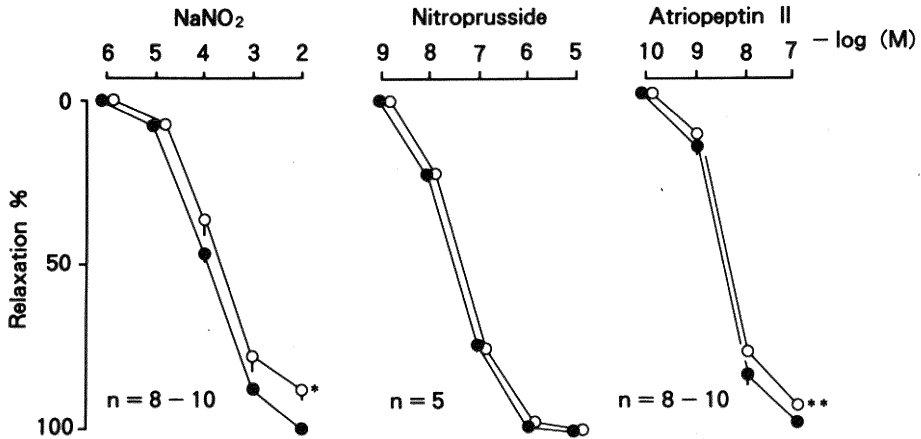


図2 内皮細胞を剥離し, phenylephrine (Phe) で収縮させたウサギ大動脈標本の NaNO_2 , sodium nitroprusside (SNP), atriopeptin II による弛緩に対する methylene blue (MB) 前処理の効果. 10^{-5}M MB で15分間処理の前 (●) と後 (○) に弛緩薬を累積的に投与した場合の用量-作用曲線. 弛緩は 10^{-7}M Phe の収縮に対する%で表し, 薬物の濃度はすべてマグヌス管中の濃度で表した. 5~10羽のウサギから抽出した5~10個の大動脈標本から得た値の平均値±標準誤差. それぞれの図表で, NaNO_2 と atriopeptin II の高濃度の部分でのみ MB 存在下の値と, MB 非存在下の値の間で有意差がみとめられた (*: $p < 0.05$).

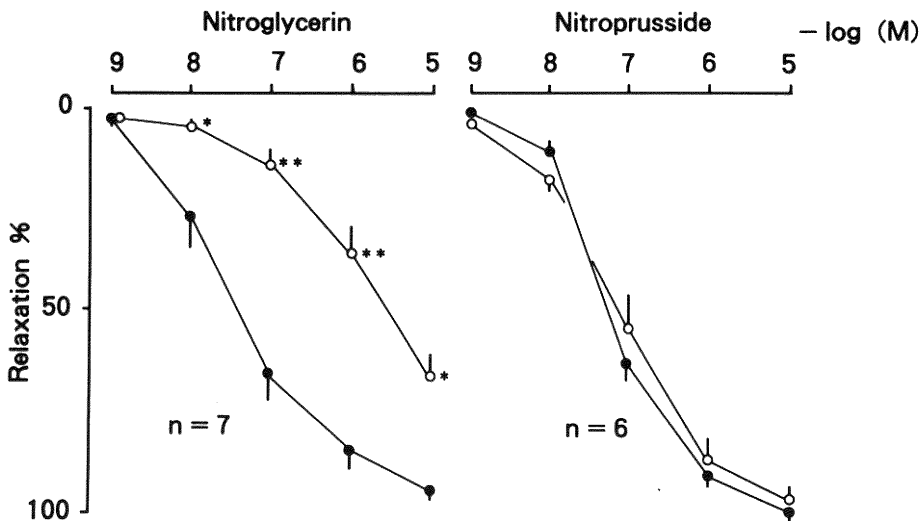


図3 内皮細胞を剥離し, 100mM KCl で収縮させたイヌ冠動脈標本の nitroglycerin (NTG) と sodium nitroprusside (SNP) による弛緩に対する methylene blue (MB) 前処理の効果. MB を加える1時間前に prazosin (10^{-8}M) を加えた. 10^{-5}M MB で15分間処理する前 (●) と後 (○) に弛緩薬を累積的に投与したときの用量-作用曲線. 弛緩は100mM KCl の収縮に対する%で表し, 薬物の濃度はすべてマグヌス管中の濃度で表した. 6~7匹のイヌから抽出した6~7個の冠動脈標本から得られた値の平均値±標準誤差. NTG については, MB 存在下の値と, MB 非存在下の値に有意差があった (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

ウサギ大動脈標本の組織内 cGMP 量変化に対する MB 15分処理の影響

図 4 に NTG (10^{-6} M) と NO (3.3×10^{-6} M) による組織内 cGMP 量の変化の時間経過を示す。弛緩薬の濃度は、前の実験において約80%の弛緩を示した濃度を選んだ。NTG と NO は組織内 cGMP 量を有意に増加させたが、増加は一過性であった。図に示したように、MB (10^{-5} M) で15分処理した群では、cGMP 量の増加は有意に抑制された。

図 5 に組織内 cGMP 量の NaNO_2 (10^{-3} M) と SNP (10^{-6} M) による変化の時間経過を示す。弛緩薬の濃度は、やはり約80%の弛緩を示す濃度を選んだ。NTG と NO はともに組織内 cGMP 量を有意に増加させ、しかもその増加は持続的であった。cGMP 量のこの増加は

MB (10^{-5} M) 15分前処理で抑制されなかった。

図 6 にウサギ大動脈における NTG による弛緩と組織内 cGMP 量の増加の関係を示す。弛緩 (%: Y軸) と cGMP 量の増加の割合 (X軸) とはよい相関を示した ($Y=0.724 \times -3.33$, $r=0.971$)。これは Kukovetz ら¹¹⁾の結果とも一致する。相関曲線が、グラフ横軸の cGMP 増加量の1倍の部分 (すなわち増加していない部分) とほぼ交叉する事は、NTG による弛緩が基本的に cGMP の増加によるものである事を示していると考ええる。

他の動物の血管の弛緩に対する MB の抑制効果

図 7 に NTG と SNP によるモルモットとラットの大動脈リング標本の弛緩とそれに対する MB の抑制効果を示した。内皮細胞を剥離した標本を Phe で収縮さ

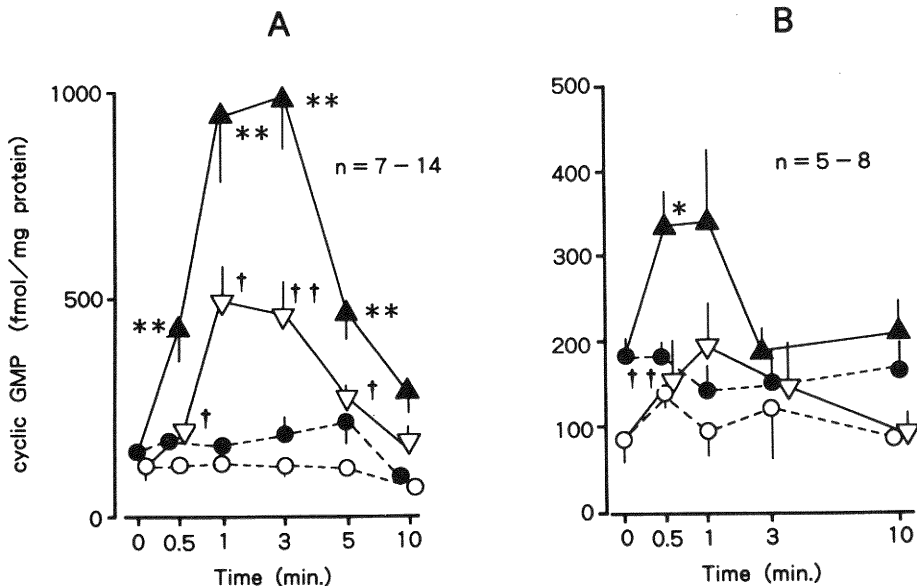


図 4 内皮細胞を剥離し、phenylephrine (10^{-7} M) で収縮させたウサギ大動脈標本の組織内 cGMP 量変化の時間経過

(A) 10^{-6} M nitroglycerin (NTG) は組織内 cyclic GMP (cGMP) 量を一過性に増加させた。methylene blue (MB) は、その増加を有意に抑制した。 10^{-6} M NTG (\blacktriangle)、 10^{-5} M MB + 10^{-6} M NTG (∇)、control (\bullet)、 10^{-5} M MB (\circ)。††は 10^{-6} M NTG に対し、有意に抑制された事を示す ($p < 0.01$)。n = 7-14

(B) 3.3×10^{-6} M nitric oxide (NO) は組織内 cGMP 量を増加させ、MB はその増加を有意に抑制した。 3.3×10^{-6} M NO (\blacktriangle)、 10^{-5} M MB + 3.3×10^{-6} M NO (∇)、control (\bullet)、 10^{-5} M MB (\circ)。**は control に比し有意 ($p < 0.01$)、†は 3.3×10^{-6} M NO に対し、有意に抑制された事を示す ($p < 0.05$)。n = 5-8

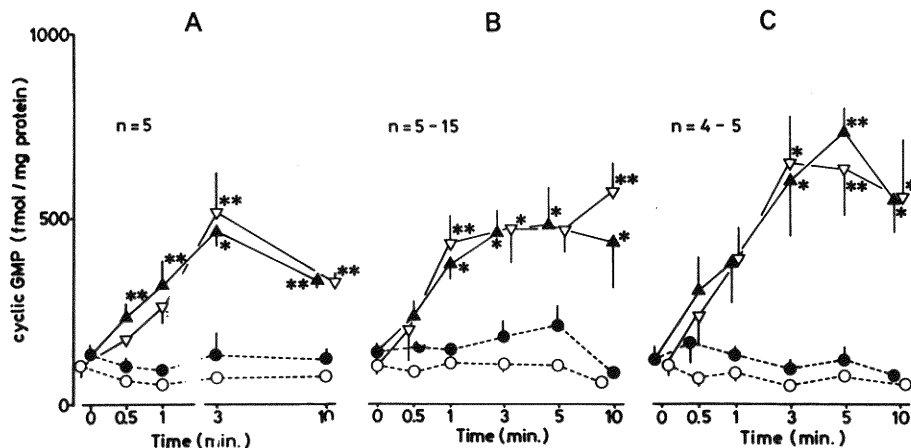


図5 組織内 cyclic GMP (cGMP) 量変化の時間経過

(A) NaNO_2 (10^{-3}M) は組織内 cGMP 量を増加させた。 10^{-5}M methylene blue (MB) は、その増加を抑制しなかった。 10^{-3}M NaNO_2 (\blacktriangle), 10^{-5}M MB + 10^{-3}M NaNO_2 (∇), control (\bullet), 10^{-5}M MB (\circ). **, * は control に対し有意の増加 (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$). $n = 5$

(B) 10^{-6}M sodium nitroprusside (SNP) は組織内 cGMP 量を増加させた。 MB (10^{-5}M) はその増加を抑制しなかった。 10^{-6}M SNP (\blacktriangle), 10^{-5}M MB + 10^{-6}M SNP (∇), control (\bullet), 10^{-5}M MB (\circ). **, * は control に対し有意の増加 (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$). $n = 5-15$

(C) atriopeptin II (10^{-8}M) は組織内 cGMP 量を増加させた。 MB (10^{-5}M) はその増加を抑制しなかった。 10^{-8}M Atriopeptin II (\blacktriangle), 10^{-5}M MB + 10^{-8}M Atriopeptin II (∇), control (\bullet), 10^{-5}M MB (\circ). **, * は control に対し有意の増加 (**: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$). $n = 4-5$

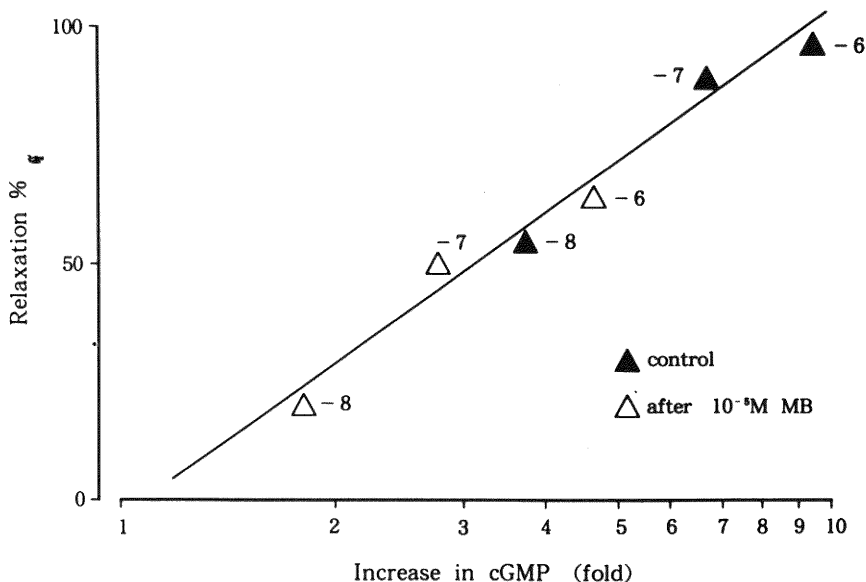


図6 nitroglycerin (NTG) によるウサギ大動脈の弛緩と cGMP 量増加の関係。弛緩 (%) を縦軸に、cGMP 増加量 (倍) を横軸 (log 目盛) にプロットした。NTG (\blacktriangle): 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}M , 10^{-5}M MB + NTG (\triangle): 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6}M ; 相関係数 $r = 0.971$. $n = 5$

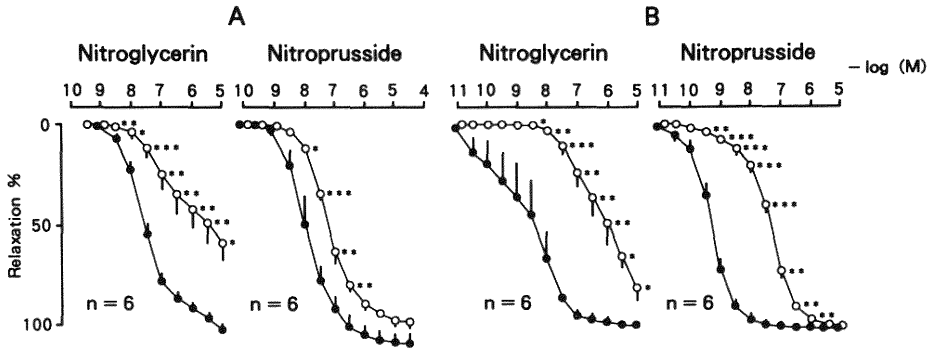


図 7 内皮細胞を剥離し, phenylephrine (Phe) で収縮させた (A) モルモットと (B) ラット大動脈標本の nitroglycerin と sodium nitroprusside による弛緩に対する, methylene blue (MB) 前処理の効果. 10^{-5} M MB で15分間処理する前 (●) と後 (○) で弛緩薬を累積的に投与したときの用量-作用曲線. 弛緩は, 10^{-7} M Phe の収縮に対する%で表した. 薬物の濃度はすべてマグヌス管中の濃度で表した. 6匹の動物から摘出した6個の大動脈標本から得られた値の平均値±標準誤差. それぞれの図表で, MB 存在下の値と, MB 存在下の値には有意差があった (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

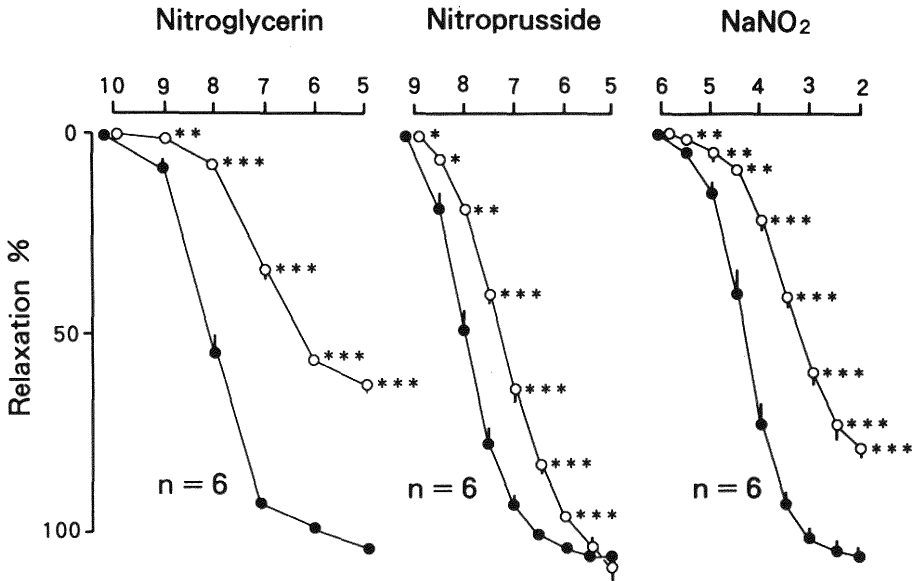


図 8 内皮細胞を剥離し, phenylephrine (Phe) で収縮させたウサギ大動脈標本の nitroglycerin と sodium nitroprusside による弛緩に対する methylene blue (MB) 60分処理の効果. 10^{-5} M MB で60分間処理する前 (●) と後 (○) で弛緩薬を累積的に投与したときの用量-作用曲線. 弛緩は, 10^{-7} M Phe の収縮に対する%で表した. すべての薬物の濃度はマグヌス管中の濃度で表した. 6羽のウサギから摘出した6個の大動脈標本から得られた値の平均値±標準誤差. それぞれの薬物について, MB 存在下の値と, MB 非存在下の値には有意差があった (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

せ、弛緩薬を累積的に投与した。ウサギ大動脈やイヌ冠動脈とは異なり、MB (10^{-5} M) 処理は NTG による弛緩のみならず、SNP による弛緩も抑制した。MB による弛緩の抑制は有意であった。

ウサギ大動脈とイヌ冠動脈の弛緩に対する MB 60分処理の阻害効果

図 8 に内皮細胞を剥離し、Phe で収縮させたウサギ大動脈標本の NTG, SNP, NaNO_2 による弛緩に対する MB (10^{-5} M) 60分処理の効果を示す。MB はこの条件下では NTG, SNP, NaNO_2 何れの用量—反応曲線も著明に右方に移動せしめた。NTG と NaNO_2 による弛緩に対しては、用量—反応曲線の右方移動のみならず、最高用量による弛緩の抑制も起した。

MB 60分処理は、8-Br cyclic GMP と atriopeptin II によるウサギ大動脈の弛緩に対しては、何ら効果を表さなかった (図 9)。

図 10 にイヌ冠動脈標本の NTG と SNP による弛

緩に対する MB (10^{-5} M) 60分処理の結果を示す。イヌ冠動脈は内皮細胞を剥離し、KCl で予め収縮させた。MB は NTG による弛緩の用量—反応曲線を著明に右方へ移動せしめたが、SNP による弛緩では、右方移動は殆んどみられなかった。

ウサギ大動脈の cGMP の増加に対する MB 60分処理の効果

図 11 に NTG, SNP, NaNO_2 によるウサギ大動脈の弛緩に対する MB 60分処理の効果を示す。NTG でのみ有意の抑制がみられた。

考 案

今回の検討で、NTG, NO による弛緩と cGMP の増加が MB (10^{-5} M) により抑制された事は、Gruetter¹²⁾, Holtzmann¹³⁾, Martin⁸⁾, Kreye⁶⁾ の実験結果と一致する。SNP と NaNO_2 による弛緩に対する MB (10^{-5} M) の抑制効果に関してはいくつかの報告がある。

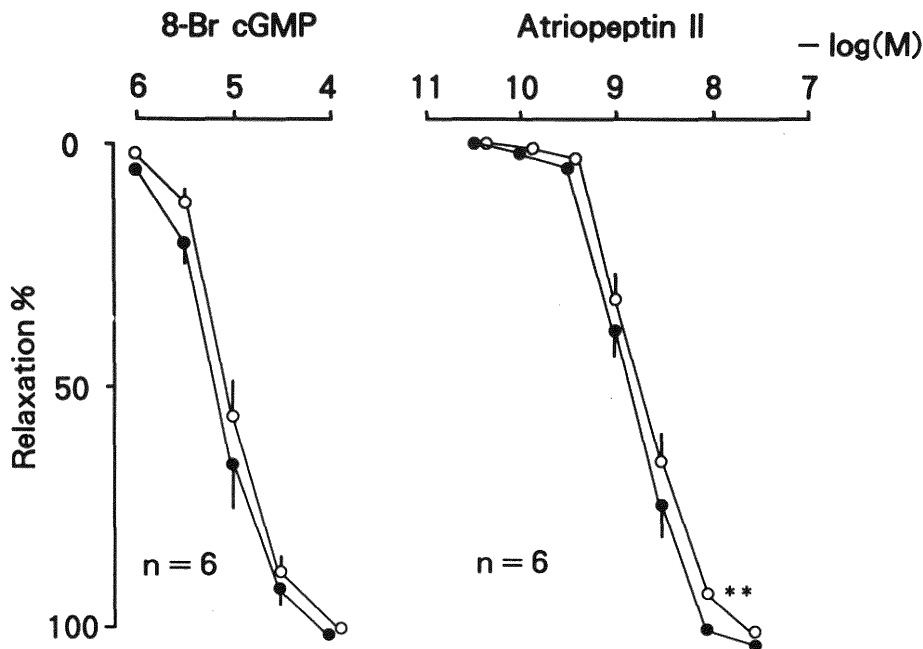


図 9 内皮細胞を剥離し、phenylephrine (Phe) で収縮させたウサギ大動脈標本の 8-bromo guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br cGMP) と atriopeptin II による弛緩に対する methylene blue (MB) 60分処理の効果。 10^{-5} M MB で60分間処理する前(●)と後(○)で弛緩薬を累積的に投与したときの用量—作用曲線。弛緩は 10^{-7} M Phe の収縮に対する%で表し、薬物の濃度はすべてマグヌス管中の濃度で表した。3羽のウサギから摘出した6個の大動脈標本から得られた値の平均値±標準誤差。

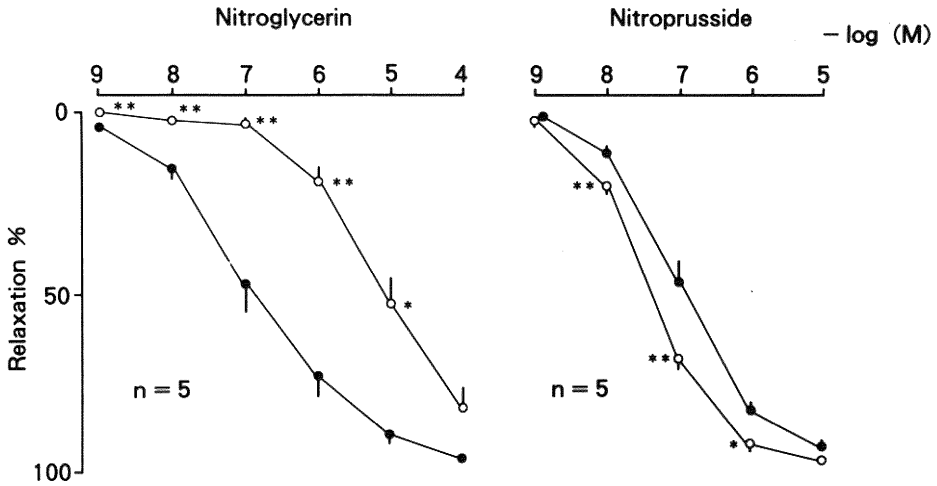


図10 内皮細胞を剥離し、100mM KCl で収縮させたイヌ冠動脈標本の nitroglycerin と sodium nitroprusside による弛緩に対する methylene blue (MB) 60分処理の効果。MB を加える1時間前に prazosin (10^{-8} M) を加えた。 10^{-5} M MB で60分間処理する前 (●) と後 (○) で弛緩薬を累積的に投与したときの用量-作用曲線。弛緩は、100mM KCl の収縮に対する%で表し、薬物の濃度はすべてマグヌス管中の濃度で表した。2匹のイヌから摘出した5個の冠動脈標本の値の平均値±標準誤差。それぞれの薬物について、MB 存在下の値と、MB 非存在下の値には有意差があった (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)。

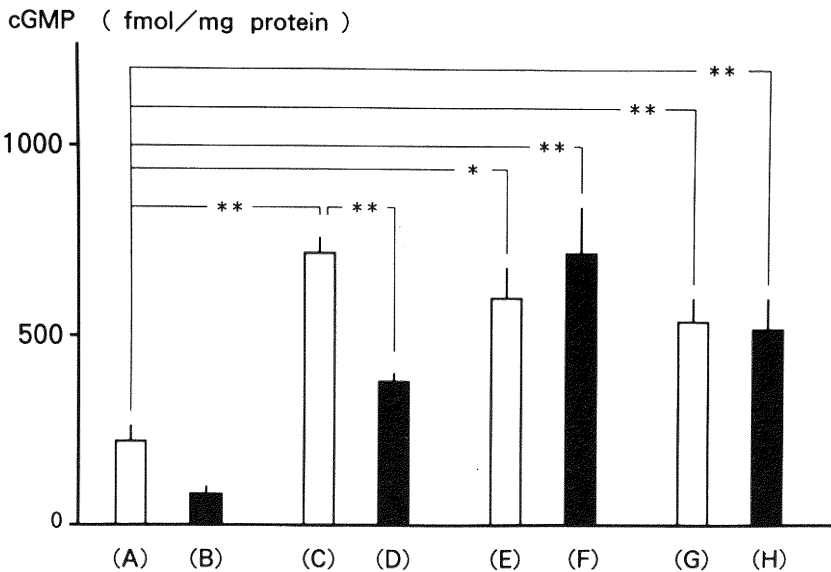


図11 内皮細胞を剥離し、phenylephrine (10^{-7} M) で収縮させたウサギ大動脈標本の組織内 cyclic GMP (cGMP) 量に対する 10^{-5} M methylene blue (MB) 60分処理の効果

(A) control, (B) 10^{-5} M MB 60分処理, (C) 10^{-6} M nitroglycerin (NTG) 投与3分後, (D) 10^{-5} M MB 60分処理+ 10^{-6} M NTG 投与3分後, (E) 10^{-6} M sodium nitroprusside (SNP) 投与3分後, (F) 10^{-5} M MB 60分処理+ 10^{-6} M SNP 投与3分後, (G) 10^{-3} M NaNO_2 投与3分後, (H) 10^{-5} M MB 60分処理+ 10^{-3} M NaNO_2 投与3分後。

Gruetter ら¹²⁾ は、ウシ冠動脈を用い、SNP と NaNO₂ の弛緩が、MB (10⁻⁵ M) により抑制される事を示した。Murad²⁾ もラット大動脈で、同様の結果を得ている。これに対し、ウサギ大動脈を用いた Kreye⁶⁾ の実験では、SNP と NaNO₂ による弛緩は、MB により抑制されないという結果になっている。今回の検討で、SNP と NaNO₂ による弛緩と cGMP の増加はウサギ大動脈では、MB (10⁻⁵ M) 15分処理では抑制されず、イヌ冠動脈でも、MB (10⁻⁵ M) 15分処理は、SNP による弛緩を抑制しなかったが、ラットとモルモットの動脈では、SNP による弛緩は、同じ MB 処理により抑制され SNP と NaNO₂ の弛緩に対する MB の抑制効果に関しては、種差が存在すると考えられた。この動物の種による MB の抑制効果の違いは、MB の血管平滑筋への透過性の違いによるものと考え、ウサギ大動脈とイヌ冠動脈で MB 60分処理実験を行った所、ウサギ大動脈では SNP (と NaNO₂) の弛緩の抑制がみとめられたが、イヌ冠動脈では抑制は見られなかった。また、これらの弛緩薬による cGMP の増加は、MB 60分処理でも抑制されなかった。これらの事より、MB 60分処理による阻害の機序は、15分処理による阻害の機序とは異なるものと考えられる。MB 60分処理では NTG の用量—反応曲線の右方移動のみではなく、最も高濃度での弛緩反応の抑制も見られた事は、この結論と一致する事実である。MB のこの第二の作用を発現させるには、組織内の MB の濃度は高濃度でなければならず、ウサギ大動脈の場合には、15分間の処理は、短か過ぎ MB の浸透が充分でなかったのであろう (これはイヌ冠動脈の場合も同様である)。一方、モルモットとラットでは、MB が細胞質中によく浸透するために、MB 15分処理で SNP と NaNO₂ の弛緩が抑制されたものと考えられる。事実、これら2つの種では、リング標本が、他の種の標本に比べ、非常に強く MB で染まっていた。今回の実験で particulate GC を活性化する atriopeptin II¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ による弛緩と cGMP の増加は MB 60分処理でも阻害されなかった。従って、SNP と NaNO₂ による弛緩に particulate GC が関与しているとは、考えにくい。8-Br cyclic GMP の弛緩効果が、MB 60分処理で阻害されなかった事より、高濃度の MB は、GC 活性化の前段階、またはそれと平行した部分、たとえば、カルシウムチャンネルの活性化、膜の破壊、pH の変化などを引き起こす事により、弛緩を抑制している可能性が考えられた。

謝 辞

御指導いただいた今井昭一教授、仲沢幹雄助教、吉田 豊講師、河田登美枝、石橋隆治助手に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Schultz, K.D., Schultz, K. and Schultz, G.: Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens. *Nature*, **265**: 750~751, 1977.
- 2) Murad, F.: Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J. Clin. invest.*, **78**: 1~5, 1986.
- 3) 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.
- 4) Palmer, R.M.J., Ashton, D.S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, **333**: 664~666, 1989.
- 5) Ignarro, L.J., Burke, T.M., Wood, M.S. and Kadowitz, P.J.: Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intra-pulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228**: 682~690, 1984.
- 6) Kreye, V.A.W.: Direct vasodilation with unknown modes of action: The nitro-compounds and hydralazine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **6**: S 646~S 655, 1984.
- 7) Romanin, C. and Kukovetz, W.R.: Guanylate cyclase activation by organic nitrates is not mediated via nitrite. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **20**: 389~396, 1988.
- 8) Martin, W., Villani, G.M., Jothianandan, D. and Furchgott, R.F.: Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **232**: 708~716, 1985.
- 9) Shikano, K., Long, C.J., Ohlstein, E.H. and Berkowitz, B.A.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor and nitric

- oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**: 873~881, 1988.
- 10) **Peterson, G.L.**: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, **83**: 346~356, 1977.
- 11) **Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Wurm, A. and Poeh, G.**: Evidence for cyclic GMP-mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **310**: 129~138, 1979.
- 12) **Gruetter, C.A., Gruetter, D.Y., Lyon, J.E., Kadowitz, P.J. and Ignarro, L.J.**: Relationship between cyclic guanosine 3': 5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitropruside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **219**: 181~186, 1981.
- 13) **Holzmann, S.**: Cyclic GMP as possible mediator of coronary arterial relaxation by nicorandil (SG-75). *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **5**: 364~370, 1983.
- 14) **Ranady, E.W., Gerzer, R. and Garbers, D.L.**: Purification and Characterization of particulate guanylate cyclase from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, **258**: 8346~8351, 1983.
- 15) **Waldman, S.A., Rapoport, R.M. and Murad, F.**: Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J. Biol. Chem.*, **259**: 14332~14334, 1984.
- 16) **Tremblay, J., Gerzer, R., Vinay, P., Pang, S.C., Beliveau, R. and Hamet, P.**: The increase of cGMP by atrial natriuretic factor correlates with the distribution of particulate guanylate cyclase. *Fed. Eur. Biochem. Soc.*, **181**: 17~22, 1985.

(平成4年1月17日受付)