

---

原 著

---

Adenosine 5'-monophosphate (AMP) のモルモット  
 摘出胸部大動脈弛緩作用について

新潟大学医学部薬理学教室 (主任：今井昭一教授)

今井裕久

Mechanisms of Adenosine 5'-Monophosphate-induced Relaxation  
 in the Isolated Guinea Pig Thoracic Aorta

Hirohisa IMAI

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

In order to investigate whether a relaxation potency of adenosine 5'-monophosphate (AMP) is comparable to that of adenosine, isolated guinea pig thoracic aortas precontracted with phenylephrine were used.

In order to examine the direct relaxant effect on the smooth muscle, all preparations were deprived of endothelial layer by rubbing. Adenosine induced concentration-dependent relaxations in the aorta with an  $ED_{50}$  value of  $1.0 \times 10^{-4}$  M. The concentration-relaxation curve for adenosine was shifted to the left with  $2 \times 10^{-5}$  M of erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA), an adenosine deaminase inhibitor. This concentration of EHNA caused 97% inhibition of adenosine degradation to inosine in the aorta. Relaxation by adenosine was inhibited with 8-phenyltheophylline (8-PT), a  $P_1$  purinoceptor inhibitor. AMP caused concentration-dependent relaxations in the aorta with an  $ED_{50}$  value of  $1.2 \times 10^{-4}$  M, a value which was comparable to that of adenosine. AMP-induced relaxation was also potentiated by EHNA treatment.  $\alpha, \beta$ -methylene adenosine diphosphate (AOPCP), an ecto-5'-nucleotidase inhibitor, caused no effect on adenosine-induced relaxation, while it inhibited AMP-induced relaxation around 80%. The concentration of AOPCP used in this experiment inhibited AMP degradation.

---

Reprint requests to: Hirohisa IMAI,  
 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757  
 新潟大学医学部薬理学教室

今井裕久

tion in the aorta by 50 to 85%. These results suggest that AMP-induced relaxation is due to adenosine produced through ecto-5'-nucleotidase pathway and the relaxation potency of AMP itself is very weak.

Key words: guinea pig thoracic aorta, AMP, adenosine, 5'-nucleotidase, AOPCP  
 モルモット胸部大動脈, AMP, アデノシン, 5'-nucleotidase, AOPCP

## 緒 言

心筋の酸素不足によって引き起こされる冠血流量増加作用に adenosine が関与しているとする adenosine 仮説が Berne によって提唱されて以来<sup>1)</sup>, 内因性血管拡張物質である adenosine の冠循環調節における役割については多くの研究がなされている<sup>2)</sup>. しかし, adenosine 産生部位あるいは産生に関与する酵素群については未だ明確にされていない<sup>3)-6)</sup>. 我々は先にモルモット摘出心灌流標本を用い, adenosine 産生に必須である 5'-nucleotidase のうち細胞膜に存在する ecto-5'-nucleotidase に着目し, その特異的な阻害薬である  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene adenosine diphosphate (AOPCP) を使用して内因性 adenosine の産生メカニズムを検討し, adenosine 産生に ecto-5'-nucleotidase が関係している事を示唆した<sup>7)8)9)</sup> が, この際 AOPCP 投与により生じた心筋組織間隙の adenosine 濃度の減少は AMP 濃度の著明な増加によって埋め合わされていたにも拘らず, 冠灌流量は adenosine 濃度減少と相関した減少を示した<sup>8)</sup>. これは内因性の AMP には冠血管拡張作用がないか, あるいは非常に弱いことを示唆するものである. 従来からの報告では外因性に与えた AMP は adenosine と同程度の冠血管拡張作用を持つとされているので<sup>10)11)12)</sup>, 内因性の AMP すなわち血管の外側から作用する場合と血管の内側から作用する場合ではその作用が異なる可能性が考えられた. 一方, これまで外因性 AMP の血管平滑筋弛緩作用を検討している研究では, AMP の酵素的分解が考慮されていないので, 平滑筋あるいは血管内皮細胞に存在する 5'-nucleotidase により AMP が adenosine に変換されて作用している可能性がある. そこで本研究では AMP それ自身の平滑筋弛緩作用の有無について, モルモットの摘出胸部大動脈標本を用いて検討し, 平滑筋弛緩作用は adenosine に比較し非常に弱いことを見いだした.

## 実験方法

### 1. Phenylephrine 収縮に対する adenosine お

### よび AMP の作用

体重 510-850 g の Hartley 系雄性モルモットをエーテル麻酔下, 頸動脈より放血致死させ, 直ちに胸部大動脈を摘出した. 胸部大動脈は結合組織を剝離後, 直径 2 mm のステンレス管を内腔に差し込み10回ほど擦って内皮細胞を除去し, 幅約 3 mm のリング標本を作成した. 標本は95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気した37℃の Krebs-Henseleit 液 (NaCl: 118, KCl: 4.7, CaCl<sub>2</sub>: 2.5, MgSO<sub>4</sub>: 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.2, NaHCO<sub>3</sub>: 25, glucose: 11 mM) を満たした 10 ml の organ bath 中に負荷 0.6-0.7 g で懸垂した. 標本の一端を固定し, 他端は FD トランスデューサー (東洋 Baldwin T7-30-24) に連結し, 等尺性張力変化をレコーダー (日立 QPD-74, 056) 上に記録した. 実験は phenylephrine  $3 \times 10^{-6}$  M の収縮反応を5ないし6回繰り返す (約1時間間隔), 反応が一定になったところで被検薬である adenosine あるいは AMP を累積的に投与した. 本実験では平滑筋直接の作用の検討を目的としたため, 実験に際し, phenylephrine  $3 \times 10^{-6}$  M の収縮反応時に ACh  $10^{-6}$  M で内皮依存性の弛緩反応が発現しないことを全標本について確認した.

adenosine deaminase 阻害薬である erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine (EHNA) 処置群では phenylephrine 添加約2分後に EHNA を, AOPCP 処置群では phenylephrine 添加後収縮反応が一定になった時点 (phenylephrine 添加後約15分) で AOPCP を, それぞれ添加して phenylephrine の収縮反応が安定したところで被検薬を累積的に添加した. 8-PT 処置群は phenylephrine 添加前20分の時点で 8-PT を添加した.

なお, AOPCP および 8-PT 無処理の対照群には, それぞれ蒸留水あるいは溶媒を 10  $\mu$ l 添加した.

各実験における結果は, phenylephrine  $3 \times 10^{-6}$  M の最大収縮高を 100% とし, 被検薬により得られた弛緩をパーセントで表示すると共に, 収縮高を30%まで抑制する被検薬の用量 (ED<sub>30</sub>) および収縮高を50%まで抑制する被検薬の用量 (ED<sub>50</sub>) をそれぞれの標本の用量作用曲線より算出した.

## 2. adenosine, AMP およびその分解産物の定量

モルモット大動脈の adenosine deaminase および ecto-5'-nucleotidase の酵素活性とそれぞれの酵素の阻害薬である EHNA および AOPCP の阻害活性を以下の方法で検討した。

1. と同様、モルモット胸部大動脈の ring 標本を負荷 0.6-0.7 g で懸垂し、内皮細胞が除去されていることを確認後、1-2時間おいて実験に供した。adenosine あるいは AMP は EHNA および AOPCP の処置20分後に添加した。adenosine あるいは AMP 投与直前に organ bath 中の栄養液 1 ml を採取し、これを0分とした。さらに被検薬添加3, 10, 20分後にそれぞれ栄養液 1 ml を採取した。なお、EHNA あるいは AOPCP で処置をしない対照群にはそれぞれ 10  $\mu$ l の蒸留水を添加した。

採取した栄養液は直ちに 100  $^{\circ}$ C で3分間煮沸して分解酵素を失活させ、遠心分離 (3000 rpm, 10分) 後、その上清を定量に供した。adenosine, inosine, hypoxanthine および AMP の分離は高速液体クロマトグラフィー (Waters) を用いて行い、260 nm の紫外外部吸収で定量した。固定相には Radialpac  $\mu$  Bondpak C<sub>18</sub> を使用し、adenosine, inosine および hypoxanthine 分離定量のための移動相には 50 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10% methanol (pH 7.0) を、AMP 分離定量のための移動相には 120 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.3 mM tetrabutylammonium hydrogen sulfate, 5% acetonitril (pH 6.25) を使用した。

各分解産物の濃度は血管平滑筋の湿重量当たりで示した。また、総分解産物量として adenosine については hypoxanthine と inosine の和を、AMP については、adenosine, hypoxanthine および inosine の和を算出した。今回の研究に用いた adenosine 中に AMP は検出されず、AMP 中には 0.03% の adenosine が含まれていた。実験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、有意差検定には Student t-test を用い、危険率5%以下を有意とした。

## 使用薬物

adenosine (Sigma Chemicals), AMP (Sigma Chemicals), AOPCP (Sigma Chemicals), EHNA (Burroughs Wellcome), phenylephrine (和光純薬) は用時、蒸留水に溶解して 10 mM (EHNA は 20 mM) 溶液を調製した。8-phenyltheophylline (8-PT) (Sigma

Chemicals) は用時80% methanol (0.2N NaOH を含む) に溶解して 10 mM 溶液を調製した。その他の試薬は全て和光純薬の特級試薬を使用した。

## 実験結果

### 1. phenylephrine 収縮に対する作用

#### A) adenosine の弛緩作用

図1に示すように、phenylephrine ( $3 \times 10^{-6}$ M) 収縮に対して adenosine は  $3 \times 10^{-5}$ M より用量依存的な弛緩作用を示し、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $5.2 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ ,  $1.0 \pm 1.2 \times 10^{-4}$ M であった。adenosine deaminase の阻害薬である EHNA ( $2 \times 10^{-5}$  M) は、adenosine の用量作用曲線を有意に左方にシフトし、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $2.9 \pm 0.7 \times 10^{-5}$ ,  $8.1 \pm 2.3 \times 10^{-4}$ M となった。しかしながら、adenosine の高用量 ( $3 \times 10^{-4}$ M) の弛緩作用は EHNA 処置群で対照群より減弱していた。AMP を adenosine へ分解する酵素である ecto 5'-nucleotidase の特異的阻害薬の AOPCP ( $5 \times 10^{-5}$ M) および EHNA の存在下で、adenosine は EHNA 単独処置群と同等の弛緩作用を示し、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $2.7 \pm 0.4 \times 10^{-5}$ ,  $7.7 \pm 1.2 \times 10^{-5}$ M であり、adenosine の弛緩作用に対して AOPCP の影響は認められなかった。

EHNA ( $2 \times 10^{-5}$ M) 存在下、P<sub>1</sub> レセプターの競合的拮抗薬である 8-PT ( $3 \times 10^{-6}$ M) 処置により adenosine

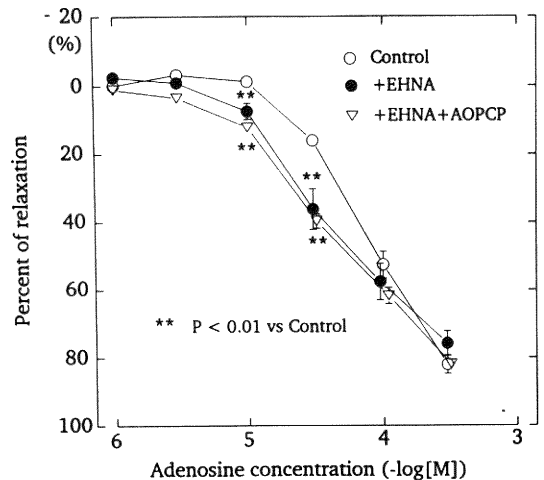


図1 モルモット胸部大動脈における phenylephrine 収縮に対する adenosine の作用  
平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6)  
EHNA:  $2 \times 10^{-5}$  M, AOPCP:  $5 \times 10^{-5}$  M.

の用量作用曲線は有意に右方にシフトし、ED<sub>30</sub> は  $2.8 \pm 0.7 \times 10^{-5} \text{M}$  から  $6.7 \pm 1.1 \times 10^{-5} \text{M}$  へ、ED<sub>50</sub> は  $8.1 \pm 1.7 \times 10^{-5}$  から  $1.3 \pm 1.9 \times 10^{-4} \text{M}$  へそれぞれ変化した (図 2)。これより、adenosine のモルモット大動脈の弛緩作用は P<sub>1</sub> レセプターを介する作用であることが示唆された。

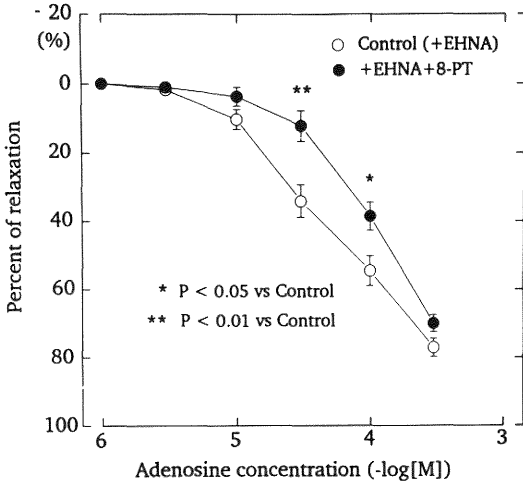


図 2 モルモット胸部大動脈における adenosine の用量作用曲線に対する 8-phenyltheophylline (8-PT) の作用  
平均値 ± 標準誤差 (n=5-6)  
EHNA:  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ , 8-PT:  $3 \times 10^{-6} \text{M}$ .

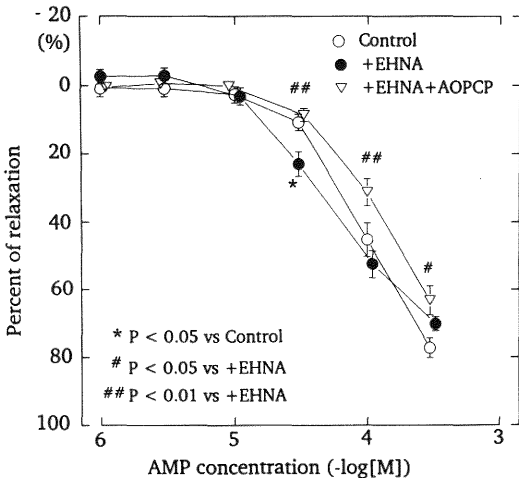


図 3 モルモット胸部大動脈における phenylephrine 収縮に対する AMP の作用  
平均値 ± 標準誤差 (n=6)  
EHNA:  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ , AOPCP:  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ .

#### B) AMP の弛緩作用

図 3 に示すように、phenylephrine ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) 収縮に対して AMP は  $3 \times 10^{-5} \text{M}$  より用量依存的な弛緩作用を示し、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $6.4 \pm 0.9 \times 10^{-5}$ ,  $1.2 \pm 1.7 \times 10^{-4} \text{M}$  であり、これは adenosine のそれとほぼ同等であった。

EHNA ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) 処置により、AMP の用量作用曲線は有意に左方にシフトし、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $4.2 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ ,  $9.9 \pm 1.5 \times 10^{-5} \text{M}$  となった。高用量の AMP ( $3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) では adenosine と同様に、EHNA 処置群で対照群よりも弛緩作用は減弱した。AOPCP ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) および EHNA 処置により、AMP の用量作用曲線は EHNA 処置群よりも右方にシフトし、ED<sub>30</sub>, ED<sub>50</sub> はそれぞれ  $9.2 \pm 2.0 \times 10^{-5}$ ,  $1.8 \pm 3.1 \times 10^{-4} \text{M}$  となった。

EHNA ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) の存在下、8-PT ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) の前処置により AMP の用量作用曲線は有意に右方にシフトし、ED<sub>30</sub> は  $4.9 \pm 0.6 \times 10^{-5} \text{M}$  から  $1.8 \pm 3.1 \times 10^{-4} \text{M}$  へと変化した (図 4)。EHNA ( $2 \times 10^{-5} \text{M}$ ) 存在下、8-PT ( $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ) および AOPCP ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) 処置により AMP の用量作用曲線はさらに右方にシフトし、最高用量の  $3 \times 10^{-4} \text{M}$  においても  $30.1 \pm 8.5$  %の弛緩を示すのみであった。

以上より、AMP は adenosine とほぼ同等な弛緩作

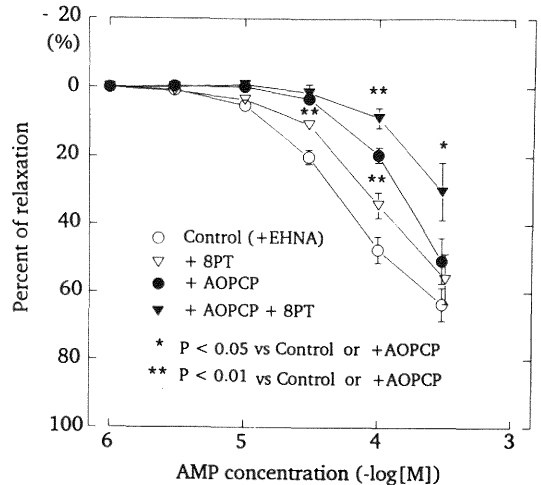


図 4 モルモット胸部大動脈における AMP の用量作用曲線に対する 8-phenyltheophylline (8-PT) の作用  
平均値 ± 標準誤差 (n=6)  
EHNA:  $2 \times 10^{-5} \text{M}$ , 8-PT:  $3 \times 10^{-6} \text{M}$ ,  
AOPCP:  $5 \times 10^{-5} \text{M}$ .

用を示すが、この弛緩作用は AOPCP によって抑制された事より大動脈標本に ecto 5'-nucleotidase が存在していることが示唆された。また 8-PT により拮抗されたので AMP の弛緩作用も adenosine と同様に P<sub>1</sub> レセプターを介するものと思われる。

## 2. 分解産物の定量

### A) adenosine

adenosine  $3 \times 10^{-4}$ M の添加により、その分解産物である hypoxanthine および inosine は経時的に増加し、20分後では hypoxanthine は  $0.51 \pm 0.07$  n mol/ml/mg, inosine は  $0.20 \pm 0.03$  n mol/ml/mg と著明に増加した。一方、EHNA ( $2 \times 10^{-5}$ M) 処置群では adenosine の  $3 \times 10^{-4}$ M を添加しても、その分解産物である hypoxanthine および inosine はほとんど増加せず、20分後でも hypoxanthine は  $0.02 \pm 0.01$  n mol/ml/mg, inosine は  $0.002 \pm 0.001$  n mol/ml/mg であった。以上より、モルモット大動脈標本に adenosine deaminase 活性があることが示された。adenosine の分解活性を総分解産物量 (hypoxanthine+inosine) で評価すると、図 5 に示すように、adenosine 単独では、20分後に  $0.71 \pm 0.11$  n mol/ml/mg となるのに対して、EHNA 処置群では adenosine はほとんど分解せず、20分後でも  $0.02 \pm 0.01$  n mol/ml/mg であり、EHNA

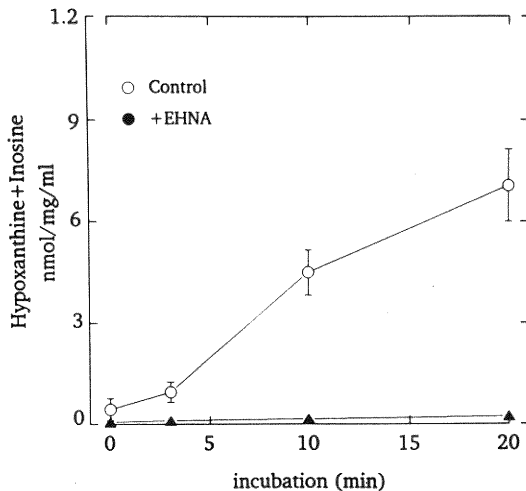


図 5 adenosine  $3 \times 10^{-4}$ M の添加によりホルモット胸部大動脈標本よりマグヌス管の栄養液中に流出する adenosine の総分解産物の経時変化に対する EHNA の作用

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

EHNA:  $2 \times 10^{-5}$ M.

は約97%の阻害を示していることが分かった。

### B) AMP

AMP は先ず adenosine に分解し、次に inosine, hypoxanthine の順に分解する。AMP の  $3 \times 10^{-4}$ M 添加により、adenosine, inosine, hypoxanthine は経時的に増加し、20分後に adenosine は  $0.48 \pm 0.07$  n mol/ml/mg, inosine は  $0.18 \pm 0.03$  n mol/ml/mg, hypoxanthine は  $0.46 \pm 0.06$  n mol/ml/mg と著明に増加した。EHNA ( $2 \times 10^{-5}$ M) および AOPCP ( $5 \times 10^{-5}$ M) を同時に処置した群では、 $3 \times 10^{-4}$ M の AMP 添加で、hypoxanthine および inosine は20分後でもまったく検出できなかったが、adenosine は経時的に増加しており、20分後で  $0.19 \pm 0.01$  n mol/ml/mg であった。分解活性を総分解産物量 (hypoxanthine+inosine+adenosine) で比較すると、図 6 に示すように、AMP 単独では経時的に増加し、20分後に  $1.12 \pm 0.15$  n mol/ml/mg であるのに対して、EHNA および AOPCP 処置後の分解産物はすべて adenosine となっており、その総分解量は著明に抑制されていた。抑制の程度は AMP 添加後 3分後および10分の時点では約50%、20分では約85%であり著明ではあるが、完全ではなかった。

なお無処置群として adenosine あるいは AMP を添加せずに同様なタイムコースで栄養液を採取して測定

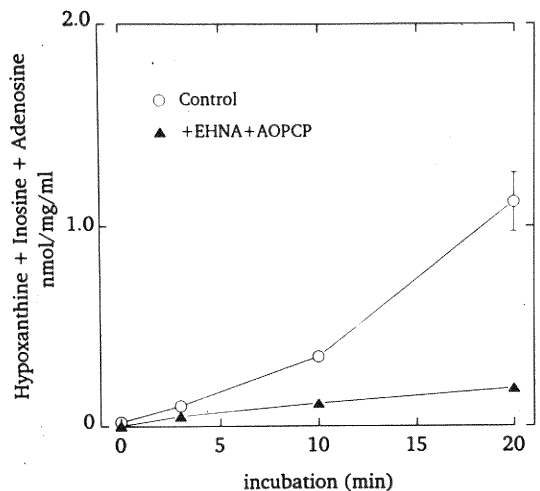


図 6 AMP  $3 \times 10^{-4}$ M の添加によりモルモット胸部大動脈標本よりマグヌス管の栄養液中に流出する AMP の総分解産物の経時変化に対する EHNA および AOPCP の作用

平均値 ± 標準誤差 (n=6)

EHNA:  $2 \times 10^{-5}$ M, AOPCP:  $5 \times 10^{-5}$ M.

したが、いずれの時点においても AMP, adenosine, hypoxanthine, inosine は検出できなかった。

## 考 察

AMP を含む adenine nucleotide の血管拡張作用の報告は数多くあり、その関係する受容体あるいは作用機序についての理解はますます深くなっている<sup>13)</sup>。またその作用の場として血管平滑筋だけではなく、血管内皮細胞の重要性も指摘されている<sup>4)12)14)</sup>。一方所謂 adenosine 仮説において、adenosine の産生部位あるいは産生に関係する酵素の研究は進んでいるものの未だに明確な結論は得られていない<sup>15)16)</sup>。我々も、ecto-5'-nucleotidase に着目し、その特異的な阻害薬である AOPCP を用いてその重要性を示唆してきた<sup>7)8)9)</sup>。その研究の中で、モルモットの摘出灌流心臓に AOPCP を投与すると、adenosine 濃度の著明な減少と共に、AMP 濃度が著明に増加するのにも、冠灌流量は adenosine 濃度の減少と相関して減少するという現象が注目を引いた<sup>8)</sup>。従来の外因性 AMP の冠灌流量あるいは血管平滑筋弛緩作用の研究では、AMP は adenosine と同程度の弛緩作用を持つ<sup>10)11)12)17)</sup>とされているので、AMP 濃度の増加にもかかわらず冠灌流量が減少するという現象は奇異に感ぜられたのである。その説明としては、外因性に投与された AMP は血管内皮細胞に作用し、EDRF を遊離してその作用を発現するが、内因性の AMP (血管の外側からの作用)には平滑筋弛緩作用が殆どない、あるいは外因性に与えた AMP は adenosine に代謝されてその作用を発現する、などが考えられる。AMP の血管弛緩作用が adenosine と同程度であるとしている報告は、AMP の adenosine への分解を念頭において検討したものはない。そこで AMP の直接的血管弛緩作用を adenosine と比較検討し、AMP 自身に adenosine と同程度の血管弛緩作用が有るか否かについて明らかにする事を目的に本研究が企画され、内皮細胞を除去したモルモット胸部大動脈を使用して、被検薬の平滑筋直接の弛緩作用の検討が行われた。

adenosine は従来の報告に見られるようにモルモット胸部大動脈平滑筋を用量に依存して弛緩させた<sup>14)</sup>。この弛緩作用は adenosine deaminase の特異的な阻害薬である EHNA 処理により増強されたので、モルモット胸部大動脈標本に adenosine deaminase が存在している事が示唆された。この事は HPLC を用いた分離定量で、inosine が時間と共に増加し、この増加が EHNA により阻害された事からも明らかとなった。

前述したように adenosine の弛緩作用は EHNA の処置により増強されたが、最高用量の  $3 \times 10^{-4}M$  では逆にその弛緩作用は対照よりも減弱した。同様の現象を Collis らも報告しており<sup>18)</sup>、adenosine の  $3 \times 10^{-4}M$  以上の高用量では、adenosine そのものの弛緩作用にその分解産物である inosine の弛緩作用が加わったためとしている。胸部大動脈標本に adenosine deaminase 活性が証明されたので、AMP の弛緩作用の評価は、EHNA 処理後に行った。これは代謝カスケードの進行を adenosine のレベルで止め、その代謝産物である inosine あるいは hypoxanthine の血管平滑筋に対する影響を避け、adenosine の作用をより直接的に検討するためであった。

従来報告されているように<sup>5)13)</sup>、adenosine による弛緩は 8-PT により競合的に拮抗されたので、 $P_1$  受容体を介する作用である事が示唆された。一方、AOPCP の adenosine 受容体に対する影響についての報告はないので、adenosine の弛緩作用に対する AOPCP の作用を検討したところ、その弛緩作用は影響されなかった。従って adenosine 受容体あるいは、adenosine 代謝に AOPCP は作用を持たないものと考えられる。今回使用した濃度で、AOPCP は AMP の分解を明確に抑制し、従来からの報告のように AOPCP は ecto-5'-nucleotidase の特異的な阻害薬である事が示された<sup>19)20)</sup>。

AMP も adenosine と同様にモルモット胸部大動脈平滑筋を用量に依存して弛緩させ、 $ED_{50}$  で比較すると adenosine が  $1.0 \pm 1.2 \times 10^{-4}M$  に対して AMP は  $1.2 \pm 1.7 \times 10^{-4}M$  であり、ほぼ同程度の弛緩作用を持つ事が示された。またその弛緩作用は 8-PT により抑制されたので、その作用は adenosine と同様に  $P_1$  受容体を介する弛緩作用である事が示唆された。さらに adenosine deaminase 阻害薬である EHNA により adenosine と同様にその弛緩作用が増強されたので、AMP の弛緩に adenosine が関与している事が強く示唆された。

また AMP の弛緩作用は ecto-5'-nucleotidase の特異的な阻害薬である AOPCP ( $5 \times 10^{-5}M$ ) の処置により抑制されたので、adenosine deaminase だけでなく ecto-5'-nucleotidase が胸部大動脈に存在する事が示唆された。実際、栄養液中の AMP から adenosine への分解も AOPCP により抑制されたので、ecto-5'-nucleotidase がモルモット胸部大動脈標本にも存在する事が明確となった。AMP の弛緩作用は AOPCP の処置により  $ED_{50}$  で比較すると約 50% 抑制され、また

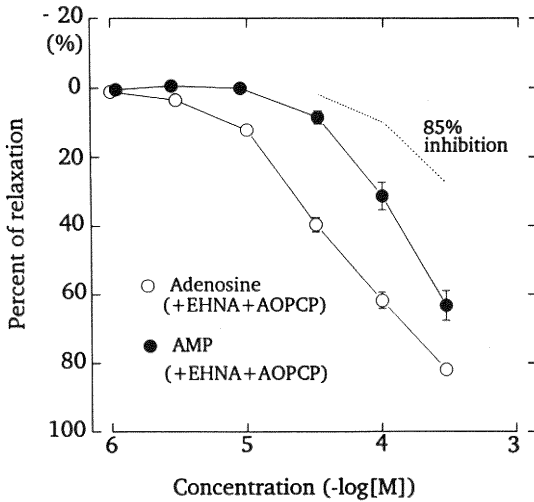


図7 EHNA ( $2 \times 10^{-5}$  M) および AOPCP ( $5 \times 10^{-5}$  M) 処理モルモット胸部大動脈における phenylephrine 収縮に対する adenosine および AMP の作用

平均値  $\pm$  標準誤差 (n=6)

EHNA:  $2 \times 10^{-5}$  M, AOPCP:  $5 \times 10^{-5}$  M, 85% inhibition: AMP の用量作用曲線より, AMP の分解で作られる adenosine (AMP 濃度の15%) の弛緩作用の15%分を差し引いた AMP の用量作用曲線。

栄養液中の分解産物から見ても AOPCP の処置により測定時間により多少異なるものの, 50%–85%の抑制が見られ, 弛緩作用の抑制と ecto-5'-nucleotidase による adenosine への分解抑制作用とは平行していた。この事は, ecto-5'-nucleotidase を介した adenosine への分解が AMP の弛緩作用に強く関係していることを示唆している。

AMP の弛緩作用を adenosine のそれと比較すると, それぞれ単独ではほぼ同等の弛緩作用を示すが, EHNA および AOPCP 処置後の AMP の弛緩作用は図7に示すように ED<sub>30</sub> で比較すると adenosine の1/3の効力であった。しかしながら, この AMP の弛緩作用には前述したように,  $5 \times 10^{-5}$  M の AOPCP で抑制できなかった ecto-5'-nucleotidase によって産生された adenosine の作用が加味されている。そこで, AOPCP による AMP の分解の抑制を85%と仮定し(図6)加えた AMP の15%は adenosine として作用したものとして, AMP の弛緩作用からこの量の adenosine によると思われる作用を差し引くと, 図7の点線の様な用量作用曲線が得られる。この曲線から想定される AMP

の弛緩作用の ED<sub>30</sub> は約  $3 \times 10^{-4}$  M であり, その効力は adenosine の1/10と言う事になる。従って, AMP の弛緩作用は最大限に見積っても adenosine の約1/10と言う事になるが, adenosine 受容体近傍で産生される adenosine はさらに多いことが考えられるので, AMP 本来の弛緩作用はさらに弱いものと推察される。

細胞外の ATP, ADP および AMP は心筋あるいは血管平滑筋においてそれぞれ ATPase, ADPase, 5'-nucleotidase によって速やかに adenosine へ分解されることが知られている<sup>15)</sup>。さらに adenosine も adenosine deaminase によって inosine へと分解されるわけであるから, これら adenine nucleotide の作用を検討する場合には代謝の過程を充分考慮する必要がある。すなわち, 組織によって代謝を受ける物質の真の作用を明らかにするには代謝の進行を止めて検討する必要がある。見かけの作用だけで判断しては, そのものの作用を見誤る可能性があることを今回の実験は示唆するものである。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み, 終始ご懇篤なご指導と共に細部にわたりご校閲を賜った恩師 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, ご助言並びにご協力をいただきました 仲澤幹雄助教授に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Berne, R.M.: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am. J. Physiol.*, **204**: 317–322, 1963.
- 2) Berne, R.M.: The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circ. Res.*, **47**: 807–813, 1980.
- 3) Pearson, J.D., Carleton, J.S. and Gordon, J.L.: Metabolism of adenine nucleotides by ectoenzymes of vascular endothelial and smooth-muscle cells in culture. *Biochem. J.*, **190**: 421–429, 1980.
- 4) Schutz, W., Schrader, J. and Gerlach, E.: Different sites of adenosine formation in the heart. *Am. J. Physiol.*, **240**: H963–970, 1981.
- 5) Moody, C.J., Meghji, P. and Burnstock, G.: Stimulation of P<sub>1</sub>-purinoceptors by ATP depends partly on its conversion to AMP and adenosine and partly on direct action. *European J. Phar-*

- macol., **97**: 47~54, 1984.
- 6) **Dendorfer, A., Lauk, S., Schaff, A. and Nees, S.**: New insights into the mechanism of myocardial adenosine formation. In: Topics and perspectives in adenosine research. pp 170~184 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 1987.
  - 7) **Imai, S., Nakazawa, M., Imai, H. and Jin, H.**: 5'-nucleotidase inhibitors and the myocardial reactive hyperemia and adenosine content. In: Topics and perspectives in adenosine research. pp 416~424 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1987.
  - 8) **Nakazawa, M., Jin, H., Matsuda, H. and Imai, S.**: Role of ecto-5'-nucleotidase on the hypoxia-induced adenosine formation in the perfused guinea pig heart. In: Regulation of coronary blood flow. pp 133~146 Springer-Verlag, Tokyo Berlin 1991.
  - 9) **Imai, S., Chin, W., Jin, H. and Nakazawa, M.**: Production of AMP and adenosine in the interstitial fluid compartment of the isolated perfused normoxic guinea pig heart. Pflügers Arch., **414**: 443~449, 1989.
  - 10) **Winbury, M.M., Papierski, D.H., Hemmer, M.L. and Hambourger, W.E.**: Coronary dilator action of the adenine-ATP series. J. Pharmacol. Exper. Therap., **109**: 255~260, 1953.
  - 11) **Wolf, M.M. and Berne, R.M.**: Coronary vasodilator properties of purine and pyrimidine derivatives. Circ. Res., **4**: 343~348, 1956.
  - 12) **Shirahase, H., Usui, H., Manabe, K., Kurahashi, K. and Fujiwara, M.**: Endothelium-dependent contraction and -independent relaxation induced by adenine nucleotides and nucleoside in the canine basilar artery. J. Pharmacol. Exp. Ther., **247**: 1152~1157, 1988.
  - 13) **Burnstock, G. and Kennedy, C.**: A dual function for adenosine 5'-triphosphate in the regulation of vascular tone. Circ. Res., **58**: 319~330, 1986.
  - 14) **Headrick, J.P. and Berne, R.M.**: Endothelium-dependent and -independent relaxations to adenosine in guinea pig aorta. Am. J. Physiol., **H62**~67, 1990.
  - 15) **Pearson, J.D. and Coade, S.B.**: Kinetics of endothelial cell ectonucleotidases. In: Topics and perspectives in adenosine research. pp 145~154 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1987.
  - 16) **Borst, M.M. and Schrader, J.**: Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. Circ. Res., **68**: 797~806, 1991.
  - 17) **Gordon, J.L. and Martin, W.**: Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of <sup>86</sup>Rb efflux from isolated endothelial cells. Br. J. Pharmac., **79**: 531~541, 1983.
  - 18) **Collis, M.G., Palmer, D.B. and Baxter, G.S.**: Evidence that the intracellular effects of adenosine in the guinea-pig aorta are mediated by inosine. European J. Pharmacol., **121**: 141~145, 1986.
  - 19) **Worku, Y. and Newby, A.C.**: The mechanism of adenosine production in rat polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J., **214**: 325~330, 1983.
  - 20) **Naito, Y. and Lowenstein, J.M.**: 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Inhibition by adenine nucleotides and related compounds. Biochem. J., **146**: 645~651, 1985.

(平成 3 年 10 月 23 日 受付)