

Nitroglycerin と NO による平滑筋弛緩とそれに対する methylene blue の作用

新潟大学医学部薬理学教室 (主任: 今井昭一教授)

付 守 廷

Relaxation of Vascular and Nonvascular Smooth Muscles
by Nitroglycerin and Nitric Oxide and the
Effects Thereupon of Methylene Blue

Shou-Ting FU

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

Smooth muscle relaxant activity by nitroglycerin and nitric oxide was measured in the smooth muscle preparations of guinea pig aorta, trachea and taenia coli. The smooth muscle preparations were precontracted with either 100 mM KCl, 30mM KCl or histamine. The relaxant potency of nitroglycerin in these smooth muscles was aorta > trachea > taenia coli. In contrast, the relaxant potency of nitric oxide was aorta > taenia coli > trachea. Methylene blue inhibited relaxation by both nitric oxide and nitroglycerin in the aorta precontracted by 100 mM, 30mM K and 3×10^{-6} M histamine and in the trachea precontracted by 3×10^{-5} M histamine, but did not inhibit in the trachea precontracted by 100mM, 30mM K and in the taenia coli precontracted by 100 mM, 30mM K and histamine. These results suggest that relaxation of vascular smooth muscle caused by nitric oxide and nitroglycerine is ultimately connected with the activation of soluble guanylate cyclase, but those of the trachea and taenia coli are not related with the activation of the enzyme.

Key words: nitroglycerin, nitric oxide, methylene blue, cGMP, smooth muscle
ニトログリセリン, 酸化窒素, メチレンブルー, cGMP, 平滑筋

Reprint Requests to: Shou-Ting FU,
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

付 守 廷

I. はじめに

Nitroglycerin を代表とするいわゆる亜硝酸化合物は、近年、細胞内で NO (酸化窒素) に変化し可溶性グアニレートサイクラーゼを活性化して細胞内に cyclic GMP (cGMP) の蓄積をきたすことにより、血管平滑筋の弛緩を起すと考えられている¹⁾。しかし、血管以外の平滑筋に対する NO と亜硝酸化合物の弛緩作用がグアニレートサイクラーゼの活性化と cGMP の上昇ですべて説明できるか否かについては議論のあるところであり、未だ明確でない。本研究では血管以外の平滑筋としてモルモットの盲腸紐と気管平滑筋を用い、これらの平滑筋に対する nitroglycerin と NO の弛緩作用を同じ動物の大動脈平滑筋に対する作用と比較検討すると共に、亜硝酸化合物や NO による可溶性グアニレートサイクラーゼ活性化の特異的な抑制剤として知られている methylene blue (MB)²⁾³⁾ の影響について検討した。

II. 実験材料

1. 実験動物

体重 250~500 g の雄性 Hartley 系モルモットを用い、使用する 18~24 時間にレセルピン (10 mg/kg) を腹腔内投与した。

2. 使用薬物

1) NO 溶液の調製

NO の飽和溶液は Shikano らの方法⁴⁾ に基づき調製した。ガラス試験管に脱気した 2 ml の 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 水溶液をとり、水中にて 20 分間窒素ガスを通気した。その後、ガラス製注射器に大気圧下ポンベより直接分取した 50 ml の NO ガスを溶液に通気し、密栓後、水中に 20 分間放置した上で、窒素ガスを 20 分間通気した。以上のようにして調製した飽和 NO 溶液の濃度を $3.3 \times 10^{-3} \text{M}$ と見做して⁴⁾、使用濃度まで希釈後使用した。

2) ニトログリセリンは日本化薬株式会社より提供を受けた注射液を用いた。二塩酸ヒスタミンは和光純薬のものを使用した。レセルピンは第一製薬の注射液 (アプロロン) を用いた。

III. 実験方法

1. モルモット摘出胸部大動脈標本

モルモットの後頭部を叩打、失神させ、頸動脈を切り放血させた後、胸部大動脈を取り出し、結合組織を除去後、幅 3 mm のリング標本作製した。標本は 37°C に

加温した栄養液 (Krebs-Henseleit 液: NaCl 118 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucose 11.1 mM) を満たした Magnus 管中に懸垂し、95% O₂, 5% CO₂ の混合ガスを通気した。標本の初期負荷 1 g とし、その収縮張力を FD ピックアップ及び圧力計用増幅器 (三菱 N5901) を介してポテンシオメトリックレコーダー (日立 055) 上に記録した。標本は製作後 1 時間以上経過し安定した後実験に供した。その間 20 分おきに 3 回栄養液を交換した。収縮反応が一定になるまで 30 mM 又は 100 mM の高濃度 K 溶液、或は histamine を繰り返し与えた。nitroglycerin と NO の弛緩作用の用量反応曲線は、用いた収縮刺激により安定した持続的収縮が得られた後、薬物を累積的に投与し、投与前の収縮を 100% として求めた。MB の影響を調べる場合は、収縮を起す 30 分前に 10^{-5} の MB を加え、同様に nitroglycerin と NO の累積濃度反応曲線を求めた。高濃度 K 収縮には栄養液の NaCl を 30 mM 及び 100 mM の KCl に一部置換したものを用いた。また、histamine 収縮には、 $3 \times 10^{-6} \text{M}$ histamine を用いた。

2. モルモット摘出気管標本

モルモットの後頭部を叩打し放血致死させた後気管を摘出した。気管は摘出後、幅 4 mm のリング状に切断し、軟骨の部分を作り開いて標本とした。標本の初期負荷を 1 g とし Magnus 管に懸垂し、大動脈の場合と同様にして、累積濃度反応曲線を求めた。histamine 収縮を起す場合は $3 \times 10^{-5} \text{M}$ を用いた。

3. モルモット摘出盲腸紐標本

腹腔を切開後、結腸を持ち上げ盲回起始部より 3 cm ぐらい離れたところで盲腸紐をピンセットで摘み眼科用のハサミで摘出した。盲腸紐は長さ 2 mm の標本とし、Magnus 装置に懸垂して、大動脈の場合と同様にして濃度反応曲線を求めた。なお、histamine 収縮を起す場合は $3 \times 10^{-5} \text{M}$ を用いた。

IV. 実験結果

1. モルモット摘出胸部大動脈に対する作用

100 mM K で予め収縮させた大動脈においては nitroglycerin と NO は 10^{-8} ~ 10^{-4}M の範囲で用量依存的な弛緩を起こした。その $-\log \text{EC}_{50}$ 値はそれぞれ 4.5 と 4.6 であった。30 mM KCl で収縮させた場合は、nitroglycerin, NO に対する感受性が上昇し、弛緩作用の $-\log \text{EC}_{50}$ 値はそれぞれ 6.5 と 5.5 になった。

$3 \times 10^{-6} \text{M}$ Histamine で収縮させた大動脈において

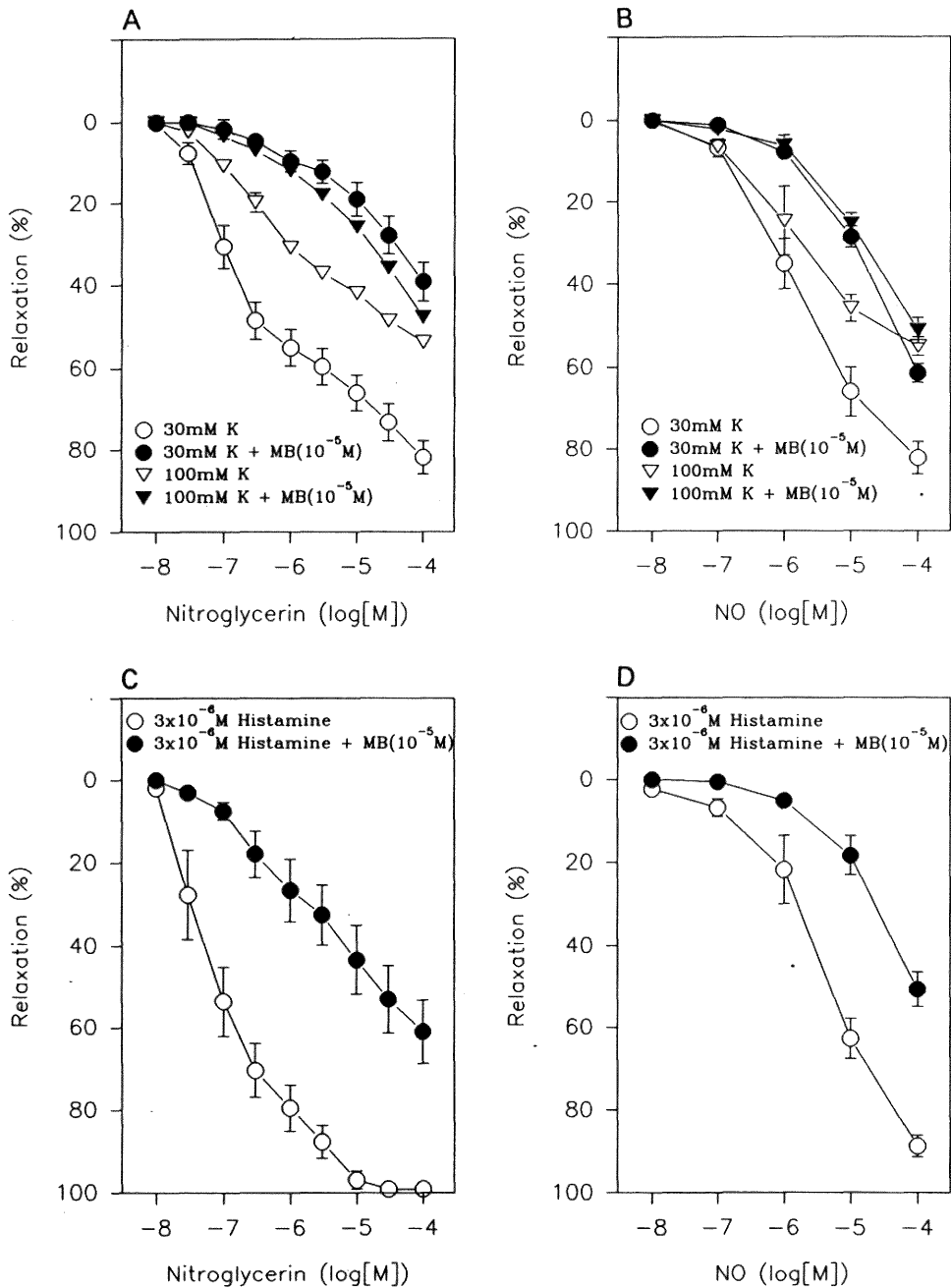


Fig. 1 Relaxation of guinea pig aorta by nitroglycerin (A and C) or nitric oxide (B and D), and the effect of methylene blue thereupon. In A and B, contraction was induced with 30mM- or 100mM-K as indicated, while, in C and D, contraction was induced with 3×10^{-6} M histamine.

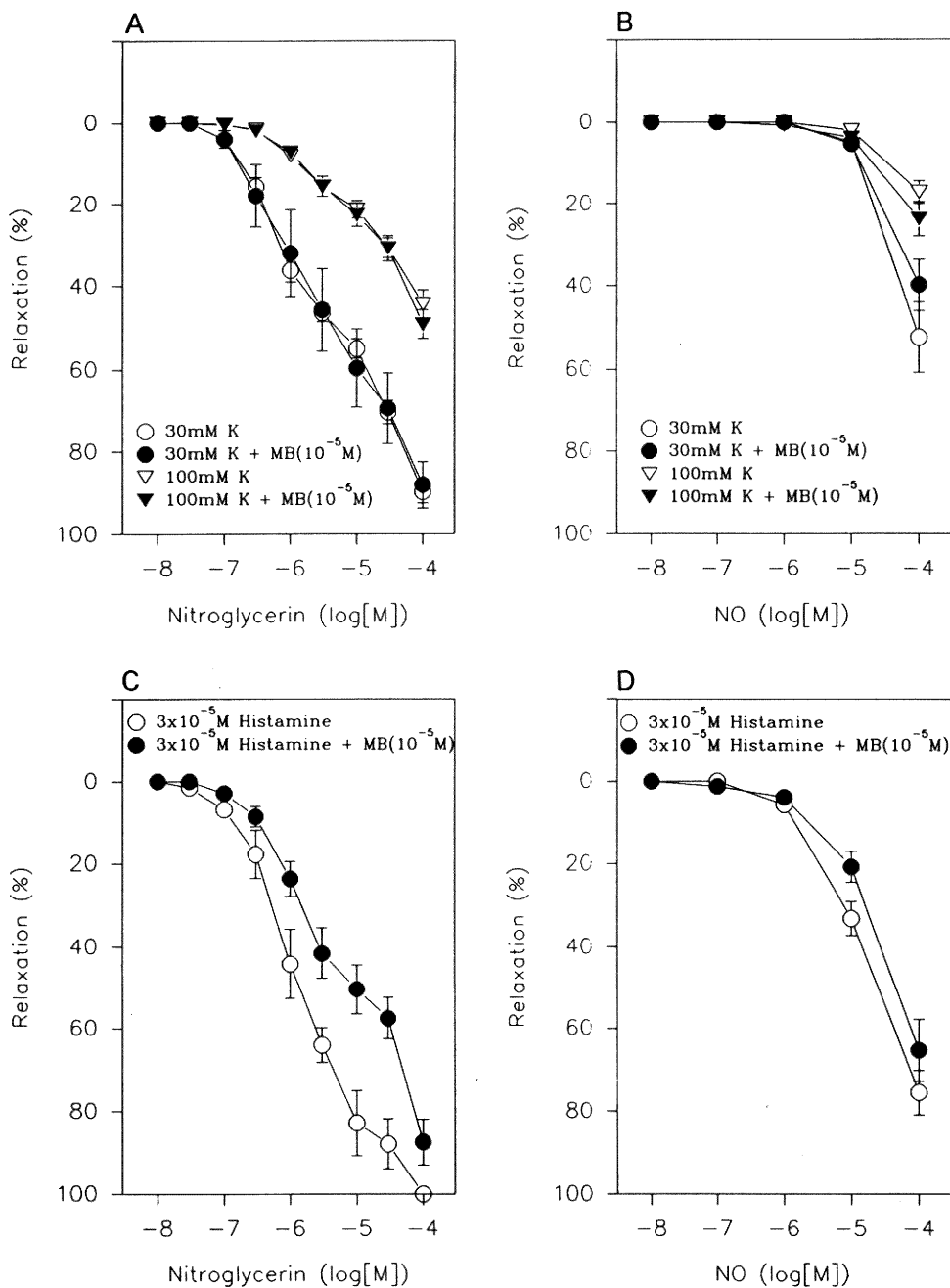


Fig. 2 Relaxation of guinea pig trachea by nitroglycerin (A and C) or nitric oxide (B and D), and the effect of methylene blue thereupon. In A and B, contraction was induced with 30mM- or 100-mM K as indicated, while, in C and D, contraction was induced 3×10^{-5} M histamine.

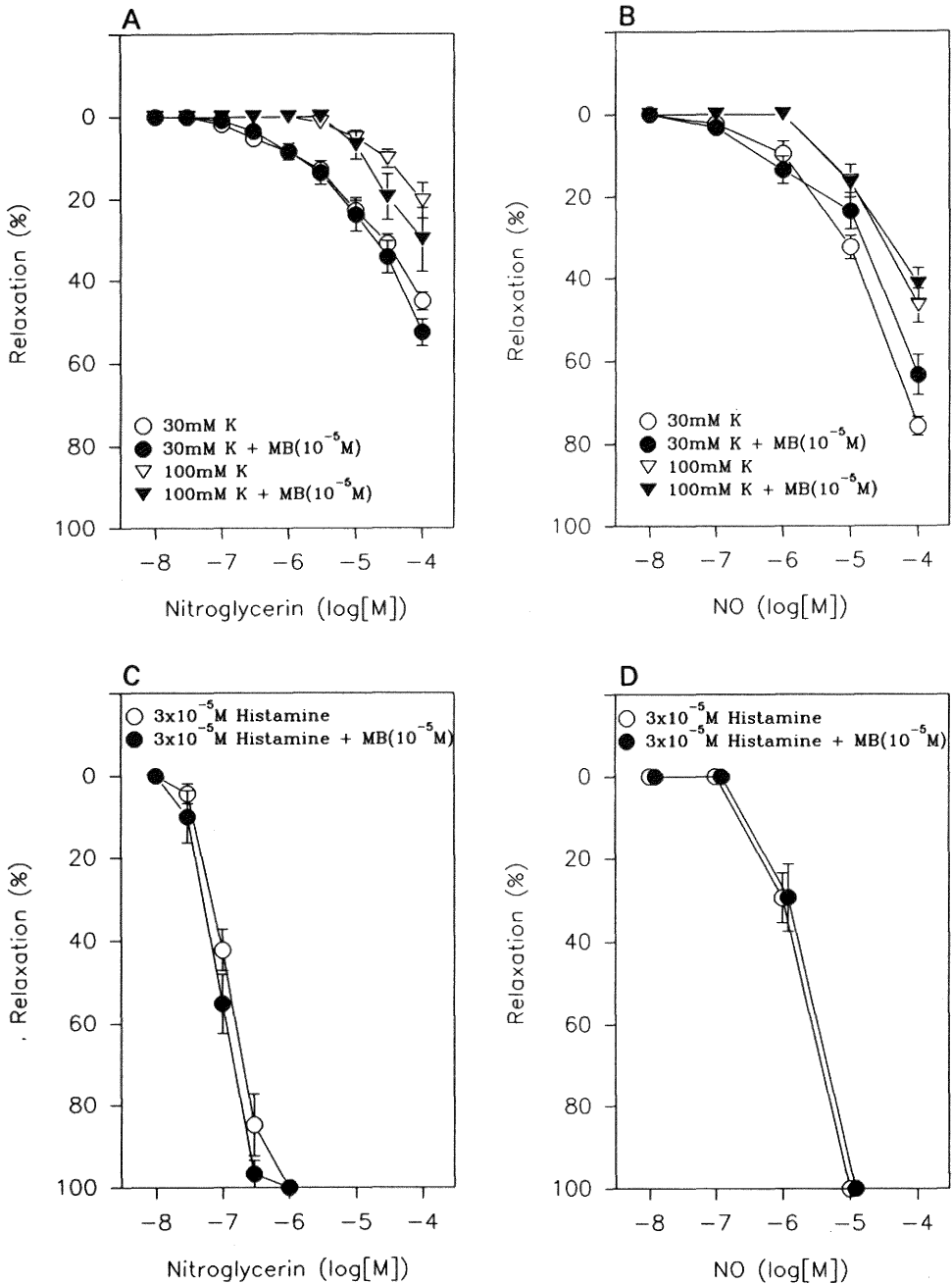


Fig. 3 Relaxation of guinea pig taenia coli by nitroglycerin (A and C) or nitric oxide (B and D), and the effect of methylene blue thereupon. In A and B, contraction was induced with 30mM- or 100-mM K as indicated, while in C and D, contraction was induced with 3×10^{-5} M histamine.

Table 1 Relaxation potency of NO and nitroglycerin on KCl- and histamine-induced contraction in guinea-pig aortic rings, trachea and taenia coli.

Agents	Preparation	-log EC ₅₀ [or maximal relaxation at 10 ⁻⁴ M] (95% confidence limits)		
		100 mM KCl	30 mM KCl	Histamine
Nitroglycerin	Aorta	4.5 (4.36-4.64)	6.5 (5.94-7.06)	7.1 (6.54-7.66)
	Trachea	44.3% (37.5-51.1)	5.3 (5.02-5.58)	5.85 (5.57-6.13)
	Taenia coli	20% (11.2-28.8)	45% (40.6-49.4)	6.9 (6.76-7.04)
Nitric oxide	Aorta	4.6 (4.06-5.14)	5.5 (5.1-5.9)	5.3 (4.96-5.64)
	Trachea	17% (11.4-22.6)	4.1 (3.3-4.9)	4.6 (4.32-4.88)
	Taenia coli	46% (37.1-54.9)	4.6 (4.48-4.72)	5.75 (5.65-5.85)

The values in parentheses indicate the range of 95% confidence limits.

は nitroglycerin と NO の -log EC₅₀ 値はそれぞれ 7.1 と 5.3 であった。いずれの場合も、10⁻⁵M MB は nitroglycerin と NO の弛緩作用の用量反応曲線を右方に移動させた (Table 1, Fig. 1)。

2. モルモット摘出気管に対する作用

100 mM と 30 mM K で予め収縮させた気管において nitroglycerin は 10⁻⁸~10⁻⁴M の範囲で用量依存的な弛緩をもたらした。30 mM K 収縮に対する nitroglycerin の -log EC₅₀ 値は 5.3 を示したが、100 mM K 収縮に対しては 10⁻⁴M でも 44.3% の弛緩しか起こさなかった。10⁻⁵ MB は K 収縮に対する nitroglycerin の弛緩作用にまったく影響しなかった。100 mM K 収縮に対する NO の弛緩作用は nitroglycerin のそれと同様に弱く、10⁻⁴M で 17% の弛緩を起こしたに過ぎなかった。30 mM K 収縮に対しては多少強い弛緩作用を示し、-log EC₅₀ 値は 4.1 であった。10⁻⁵M MB は NO の弛緩作用を多少抑制する傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

Histamine (3×10⁻⁵M) 収縮に対する nitroglycerin の弛緩作用の -log EC₅₀ 値は 5.85 であり、10⁻⁵M MB は濃度反応曲線を多少右方に移動させた。一方、NO の -log EC₅₀ 値は 4.6 であり、10⁻⁵M MB はその濃度反応曲線を多少右方に移動させる傾向を示したが変化は有意でなかった (Table 1, Fig. 2)。

3. モルモット摘出盲腸紐に対する作用

100 mM K で収縮させた盲腸紐において nitroglycerin と NO は 10⁻⁶~10⁻⁴M の範囲で用量依存的な弛緩を

もたらしたが、その作用は弱く、10⁻⁴ における最大弛緩反応はそれぞれ 20% と 46% であった。30 mM K 収縮に対しては、nitroglycerin と NO は 10⁻⁸~10⁻⁴M の範囲で 100 mM K 収縮の場合と比較し、より強い弛緩をもたらした。Nitroglycerin (10⁻⁴M) による最大弛緩は 45% であり、NO による弛緩の -log EC₅₀ 値は 4.6 を示した。

3×10⁻⁵M Histamine で予め収縮させた盲腸紐においては nitroglycerin と NO は用量依存的なかなり強い弛緩作用を示し、nitroglycerin の -log EC₅₀ 値は 6.9, NO の -log EC₅₀ 値は 5.7 であった。

K 収縮, histamine 収縮いずれの場合も、10⁻⁵M MB は nitroglycerin と NO の弛緩作用には殆ど影響を与えなかった (Table 1, Fig. 3)。

V. 考 察

亜硝酸化合物による血管平滑筋の弛緩が平滑筋細胞内の cGMP 上昇を介していることは 1970 年代に示されていたが⁵⁾、その後血管内皮細胞由来弛緩因子 (EDRF) による血管平滑筋の弛緩も cGMP を介していることが明らかになった⁶⁾。現在では EDRF は NO そのものであり、亜硝酸化合物は細胞内で NO に変化して、可溶性グアニレートサイクラーゼのサブユニットであるヘム蛋白に結合して同酵素を活性化し cGMP 濃度を上昇させると考えられている⁷⁾。しかし血管以外の平滑筋に対する NO と亜硝酸化合物の弛緩作用についてはいろいろな議論があり、血管以外の平滑筋細胞で観察される

cGMP 上昇作用は弛緩作用とは関連しないという主張もなされている⁹⁾。

本実験では NO と nitroglycerin の平滑筋に対する弛緩作用を血管平滑筋と非血管平滑筋において比較検討した。モルモット大動脈標本における K 収縮及び histamine 収縮に対して、NO と nitroglycerin は用量依存的な弛緩作用を示し、 10^{-5} M MB はその弛緩作用を競合的に抑制した。これは従来の結果と同様であり、NO と nitroglycerin が可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化を介して弛緩作用を現すことを再確認したものと見える。

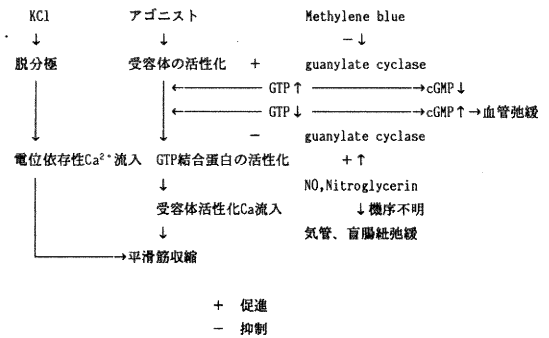
一方、気管での K 収縮、盲腸紐での K 収縮と histamine 収縮に対する NO と nitroglycerin の弛緩作用は 10^{-5} M MB により全く抑制を受けなかった。これらの結果は NO と nitroglycerin のこれらの平滑筋に対する弛緩作用は可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化を介さないことを示唆する所見である。しかし、histamine で収縮させた気管標本においては nitroglycerin の弛緩作用は 10^{-5} M MB で抑制された。

本研究で用いた 3 種類の平滑筋の感受性は収縮刺激に関係なく NO による弛緩よりも nitroglycerin による弛緩に対し高かった。又、NO と nitroglycerin の弛緩作用に対する感受性は収縮刺激によって異なる事がわかった。その傾向は各組織においてはほぼ同様であり、nitroglycerin や NO による弛緩に対し最も感受性が高いのは histamine による収縮であり、次いで、30 mM K 収縮、100 mM K 収縮の順序であった。また、nitroglycerin の弛緩作用に対する各平滑筋の感受性は、収縮刺激によらず、大動脈で最も高く、気管、盲腸紐の順序であったが、NO の弛緩作用に対する感受性はそれと異なり、大動脈、盲腸紐、気管の順序であった。(Table 1)。

Bolton⁹⁾、Bolton and Large¹⁰⁾ や Van Breemen¹¹⁾ は細胞外からの Ca^{2+} 流入を電位依存性 Ca^{2+} 流入と受容体活性化 Ca^{2+} 流入とに分類した。多くのアゴニストは受容体を活性化し、その結果としての GTP による GTP 結合蛋白質の活性化という、一連の生化学反応を介して平滑筋の収縮を起こす。従って、平滑筋細胞内の GTP 含有量が多ければ多いほど GTP 蛋白質が活性化されやすく平滑筋収縮を強めることになると考えられるので、MB により NO によるグアニレートサイクラーゼの活性化が抑制されると、同酵素の活性化による細胞内 GTP 含有量の低下がなくなるので、収縮張力の増強が起こって、NO による弛緩作用が抑制

されるという可能性も考えられる。

Histamine で予め収縮させた標本では GTP が減少しているので、NO と nitroglycerin の弛緩作用に対する感受性が高いのであろう。Histamine で収縮させた気管において MB で nitroglycerin の弛緩作用が抑制されたのは、気管では GTP の減少が他の組織に於けるよりも著しく、その為、 10^{-5} M MB でグアニレートサイクラーゼの活性化が抑制された場合の GTP の含有量の回復による収縮力増強効果が著明に現れる事になり、nitroglycerin の弛緩作用が抑制されるのであろう。つまり筆者の仮説では次の通りである。



以上は筆者の完全な仮説であり、平滑筋の収縮弛緩が GTP 結合蛋白質、GTP 及び cGMP とどのような関係を持つかそれは今後の研究に残された問題だと考えられる。

大動脈、気管、盲腸紐のいずれの場合にも 100 mM K 収縮よりも 30 mM K 収縮で NO と nitroglycerin の弛緩作用は強く現れた。この事はこれらの薬物による弛緩作用に膜電位に依存する機序も関与する事を示唆している。

又、nitroglycerin の弛緩作用に対する感受性の順位と NO の弛緩作用に対する感受性の順位とが平滑筋によって違っていた事は、nitroglycerin がすべての平滑筋細胞内で NO に変化して作用するという考えと矛盾しており、モルモット気管と盲腸紐においては nitroglycerin が NO を介さずに作用している可能性を示唆するものである。

VI. 要 約

NO と nitroglycerin の各種平滑筋に対する作用をモルモット大動脈、気管、盲腸紐標本を用いて検討した。作用は高濃度 K (30 mM, 100 mM) 及び histamine (3×10^{-6} M 或は 3×10^{-5} M) による収縮に対する弛緩

作用として観察した。いずれの平滑筋においても histamine による収縮が nitroglycerin や NO の弛緩作用に対し最も感受性が高く、次いで、30 mM K 収縮、100 mM K 収縮の順序であった。また、nitroglycerin の弛緩作用に対する感受性は、収縮刺激が何であっても、大動脈平滑筋で最も高く、次いで、気管、盲腸紐の順序であったが、NO の弛緩作用に対する感受性はそれと異なり、大動脈、盲腸紐、気管の順序であった。大動脈ではK収縮、histamine 収縮何れの場合も、NO と nitroglycerin の弛緩作用は、NO や nitroglycerin による可溶性グアニレートサイクラーゼ活性化の阻害剤である methylene blue (10^{-5} M) で抑制されたが、盲腸紐ではいずれの収縮も 10^{-5} M methylene blue で抑制されなかった。一方、気管ではK収縮の弛緩は methylene blue で抑制されなかったが、histamine 収縮の弛緩は抑制された。以上の結果から、血管平滑筋では NO や nitroglycerin による弛緩は可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化が関与しているが、気管や盲腸紐の平滑筋ではこれらの薬物による弛緩には可溶性グアニレートサイクラーゼの活性化は必ずしも関与していないと考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部薬理学教室 今井昭一教授と吉田豊講師に厚く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 今井昭一: 亜硝酸薬及び類縁化合物の作用機序。医学と薬学, 20: 633~643, 1988.
- 2) Gruetter, C.A., Barry, B.K., McNamare, D.B., et al.: Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. J. Cyclic Nucl. Res., 5: 211~224, 1979.
- 3) Grutter, C.A., Kadowitz, P.J. and Ignarro, L.J.: Methylene blue inhibits coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by nitroglycerin, sodium nitrite and amyl nitrite. Can J. Physiol. Pharmacol., 59: 150~156, 1981.
- 4) Shikano, K., Long, C.J., Ohlstein, E.H., et al.: Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 247: 873~881, 1988.
- 5) Kukovetz, W.R., Holzmann, S., Wurm, A., et al.: Evidence for cyclic-GMP mediated relaxant effects of nitro-compounds in coronary smooth muscle. Arch Pharmacol., 310: 129~138, 1979.
- 6) Rapoport, R.M. and Murad, F.: Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. Circ. Res, 52: 352~357, 1983.
- 7) Gerzer, R., Bohme, E., Hofmann, F., et al.: Soluble guanylate cyclase purified from bovine contains heme and copper. FEBS lett., 132: 71~74, 1981.
- 8) Diamond, J.: Lack of correlation between cyclic GMP elevation and relaxation of nonvascular smooth muscle by nitroglycerin, nitroprusside, hydroxylamine and sodium azide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 225: 422~426, 1983.
- 9) Bolton, T.: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol. Rev., 59: 606, 1979.
- 10) Bolton, T. and Large, W.A.: Are junction potentials essential? Dual mechanisms of smooth muscle cell activation by transmitter released from autonomic nerves. Quart. J. Exp. Physiol., 71: 1, 1986.
- 11) Van Breemen, C., Aaronson, P., Loutzenhiser, R., et al.: Ca^{2+} movement in smooth muscle. Chest, 78(suppl. 1): 157, 1980.

(平成3年3月22日受付)