

主 論 文

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

捧 博輝

新潟大学医学部薬理学教室

(主任：今井昭一教授)

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)

Key words: vascular smooth muscle
NO-forming vasodilators
atriopeptin
methylene blue
cyclic GMP

キーワード: 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 Pharma-
cology, 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),
NaNO₂はsoluble guanylate cyclase (以下GC
と略す)を活性化することにより組織内の
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nitroso-thiol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nitros
othiolによるsoluble GCの活性化はmethyle-
ne blue (以下MBと略す)で、阻害される事が
知られているが、NaNO₂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NaNO₂によるウシ冠動脈の弛緩とcGMPの蓄積がMB(10⁻⁵M)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2.5-3kg）、オスWistar系ラット（体重200-300g）、雌雄雑種イヌ（体重8-12kg）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²⁾、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（2mg/kg, 腹腔内投与）。ウサギはpentobarbital sodiumの静注（60mg/kg）により麻酔し、ラットとモルモットはdiethyl-ether吸入により麻酔した後、頸部大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剥離せしめた。イヌはthiopental sodium(35mg/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剥離した。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、または冠動脈は約2mmの幅に切り、等尺性収縮を記録するために10mlのマグ

ヌス管中に0.5-1g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 118mMol, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.2, ブドウ糖 11) を用い、95% O₂+5% CO₂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。50mM Tris-HCl, pH 7.4の緩衝液1mlをゴム栓にて密栓したガラス試験管(容量約6ml)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）50mlで試験管内の気相を満たした。試験管をvortexにかけ、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℃で $7.34\text{cm}^3/100\text{ml}$ であるから、溶液中のNO濃度は約3.3mMと仮定した。NO飽和緩衝液を、脱気した緩衝液により使用の直前に10000倍に希釈し、その $100\mu\text{l}$ をマグヌス管中に添加した。

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 のの混合ガスを十分に通気した10ml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1mlの塩酸（0.1M）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（4000rpm, 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。

使用薬物

nitroglycerin (日本化薬)、prazosin (フ
アイザー製薬)、sodium nitroprusside,
methylene blue, sodium nitrite (和光純薬)、
phenylephrine (興和)、reserpine (第一製
薬)、atriopectin 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つの
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MB15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100mM 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。

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($Y=0.724x-3.33$, $r=0.971$)。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られる。

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をせしめた。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atrio-peptin 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とめられなかった。

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NaNO₂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。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大動脈では、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 NaNO_2 ）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 II^{14,15,16)}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、仲沢幹雄助教授、吉田豊講師、河田登美枝、石橋隆治助手に深謝いたします。

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ヌ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羽のウサギから摘出した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匹のイヌから摘出した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)。

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) $3.3 \times 10^{-6}M$ 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。 $3.3 \times 10^{-6}M$ NO(\blacktriangle)、 $10^{-5}M$ MB + $3.3 \times 10^{-6}M$ NO(∇)、control(\bullet)、 $10^{-5}M$ MB(\circ)。**はcontrolに比し有意($p < 0.01$)、+は $3.3 \times 10^{-6}M$ 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) $\text{NaNO}_2(10^{-3}\text{M})$ 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 $\text{NaNO}_2(\blacktriangle)$ 、 10^{-5}M MB + 10^{-3}M $\text{NaNO}_2(\nabla)$ 、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)atrioepetin 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 Atrioepetin II (\blacktriangle)、 10^{-5}M MB + 10^{-8}M Atrioepetin 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(▲): 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} M; 10^{-5} M MB + NTG(△): 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。10⁻⁵M 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、10⁻⁷M 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非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。
10⁻⁵M 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、10⁻⁷M 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存在下での値と、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-bromoguanosine 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。
10⁻⁵M 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10⁻⁷M 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 1 1 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

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.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 327: 524

-526, 1987

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:S646-S655, 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 Poech, 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, nitroprusside, 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

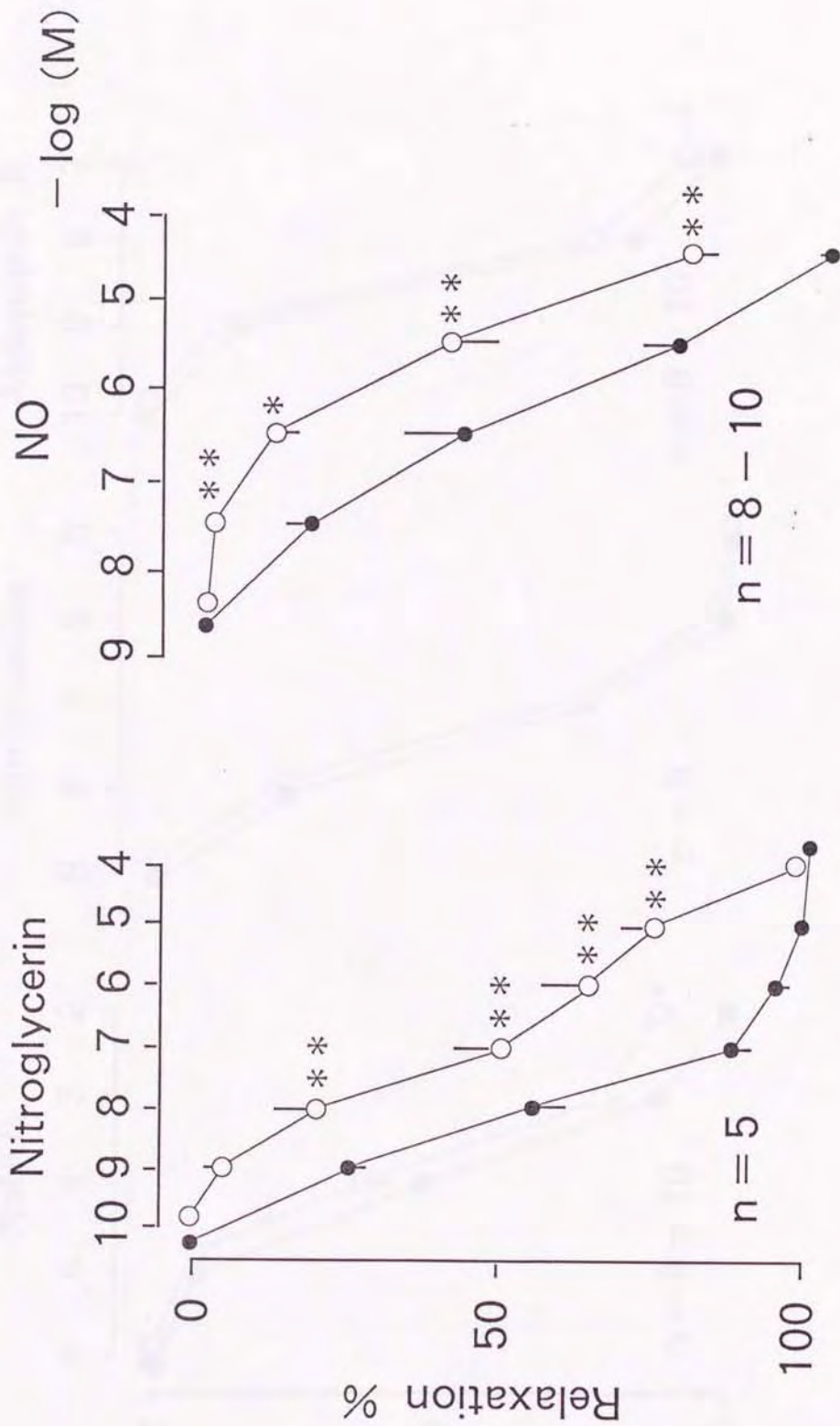
15)Waldman,S.A., Rapoport,R.M. and Murad,F.: Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. J.Biol.Chem. 259:143332-14334, 1984

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



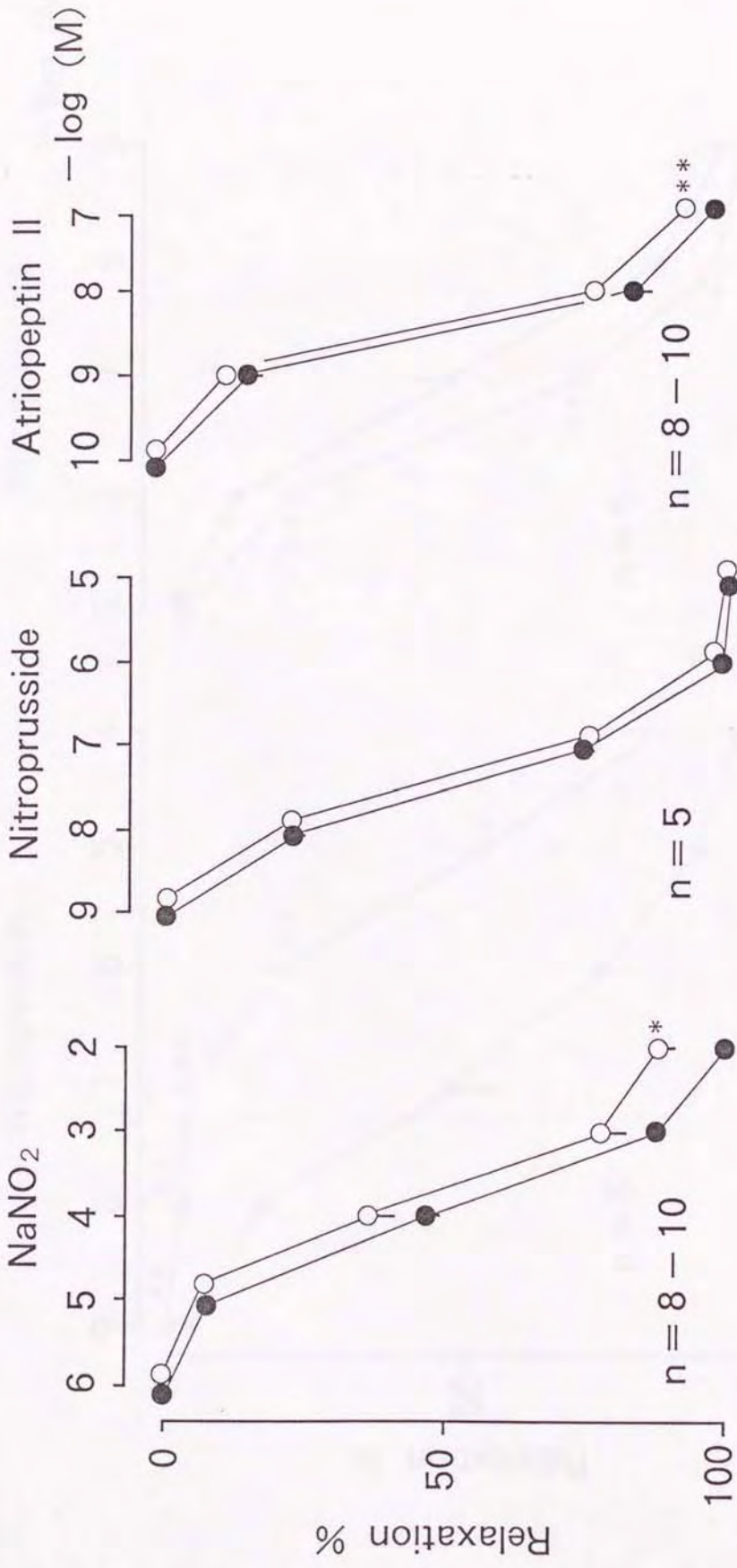


图 2

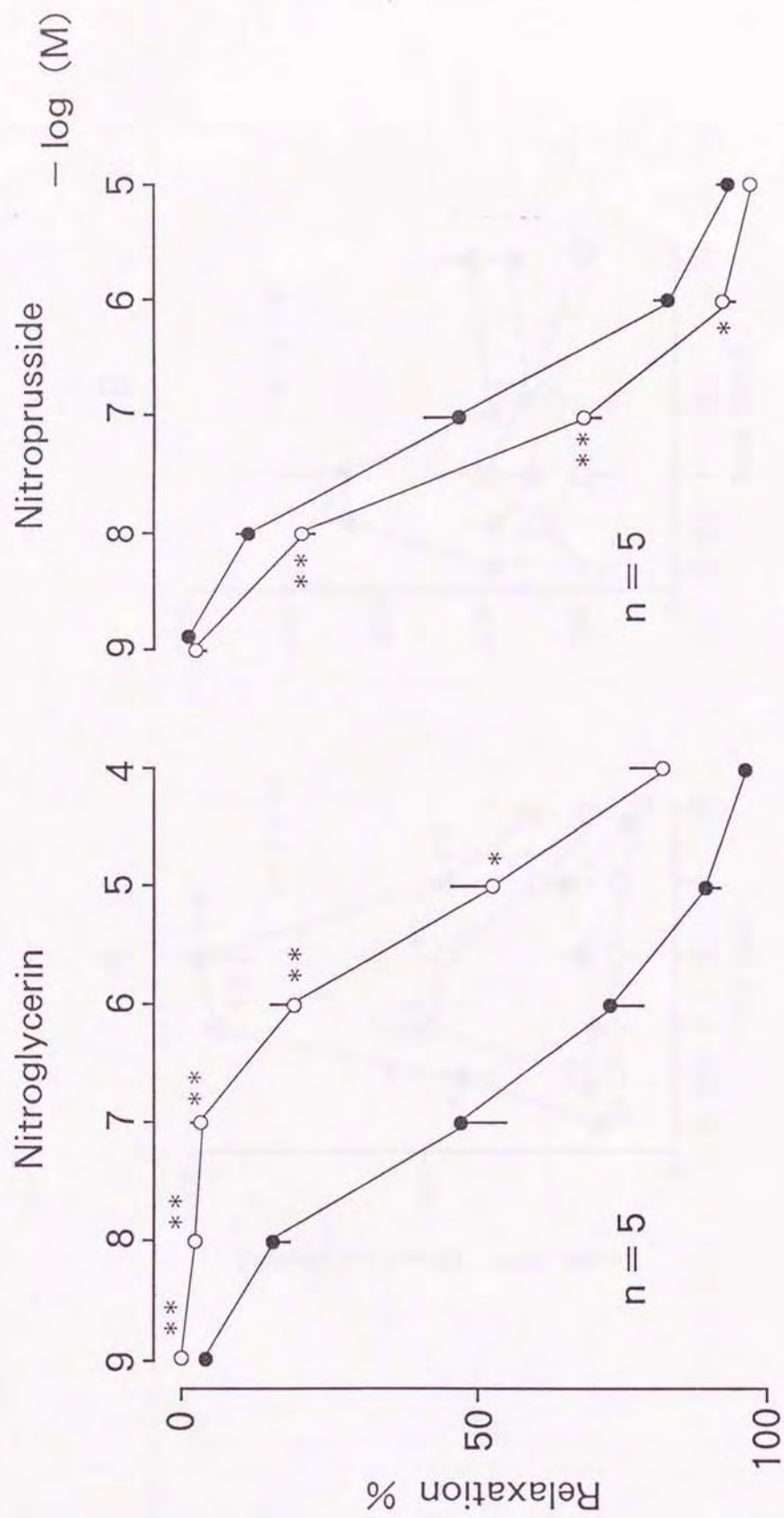


图 3

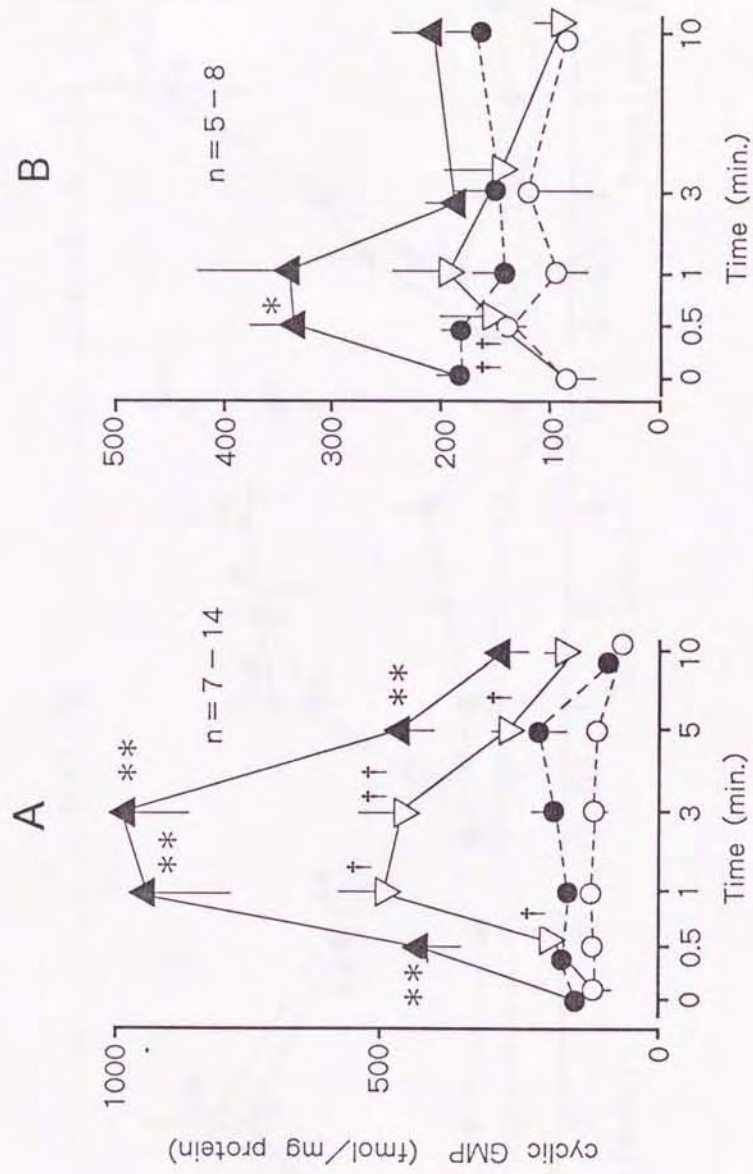


图 4

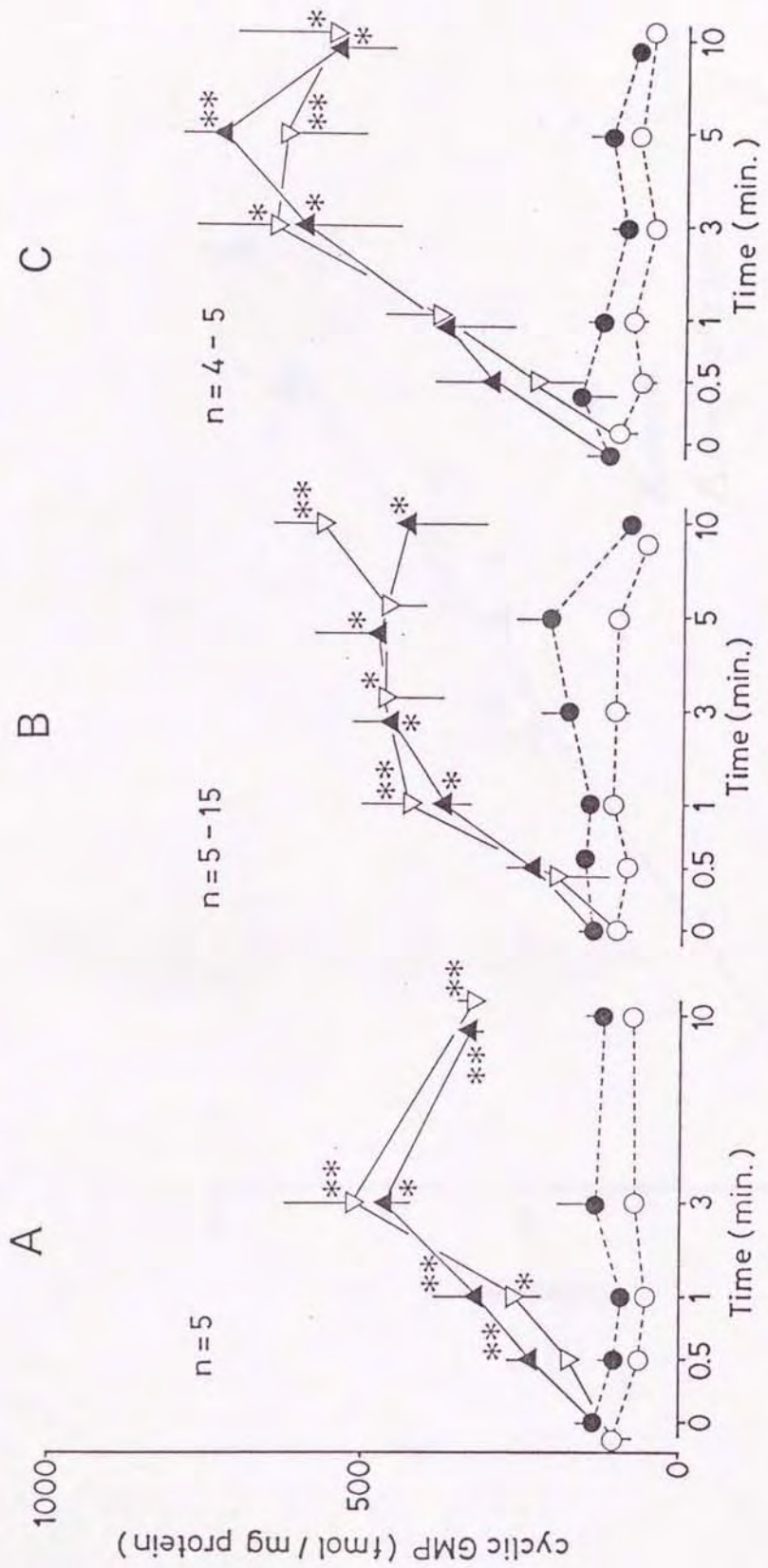


图 5

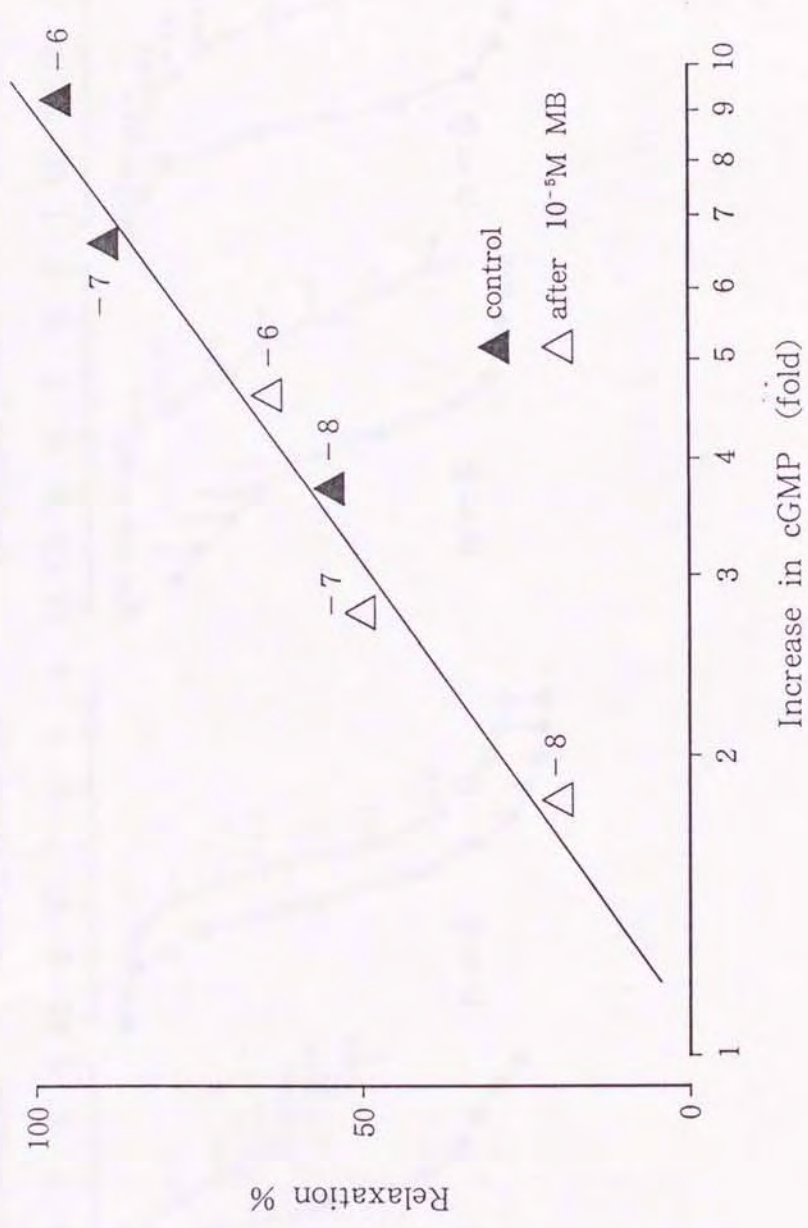


图 6

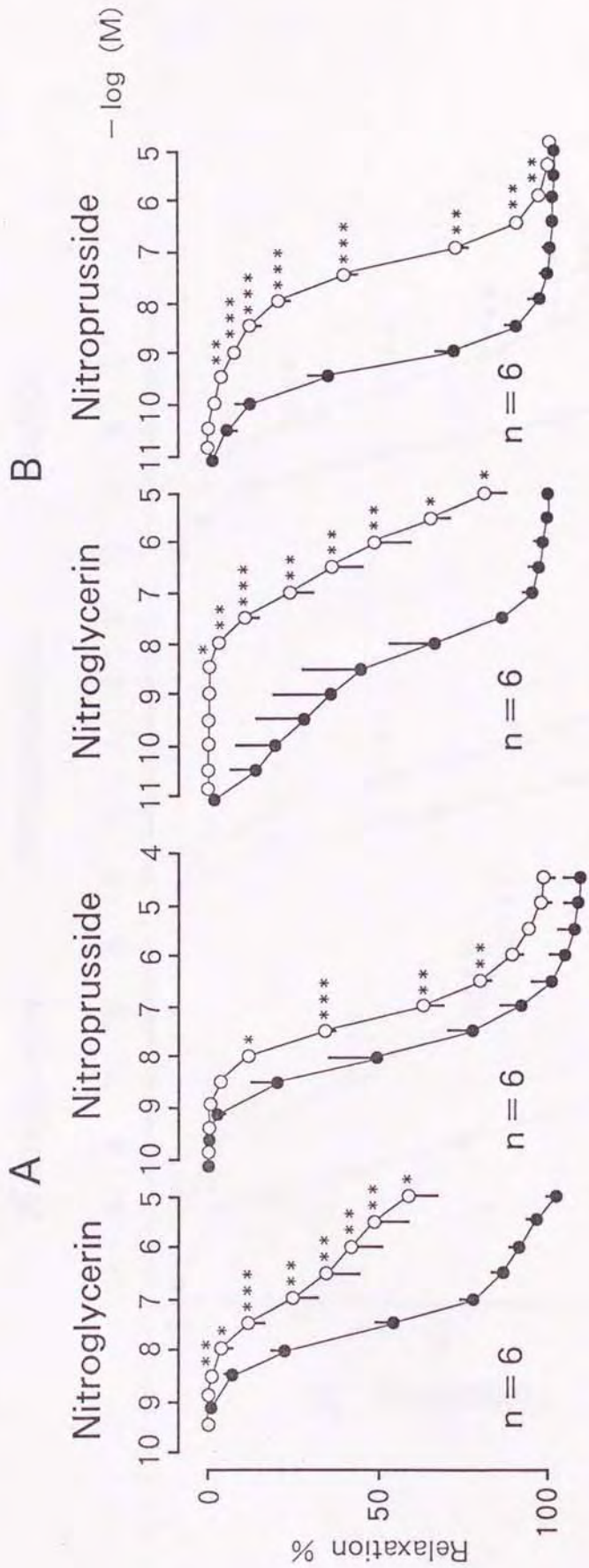


图 7

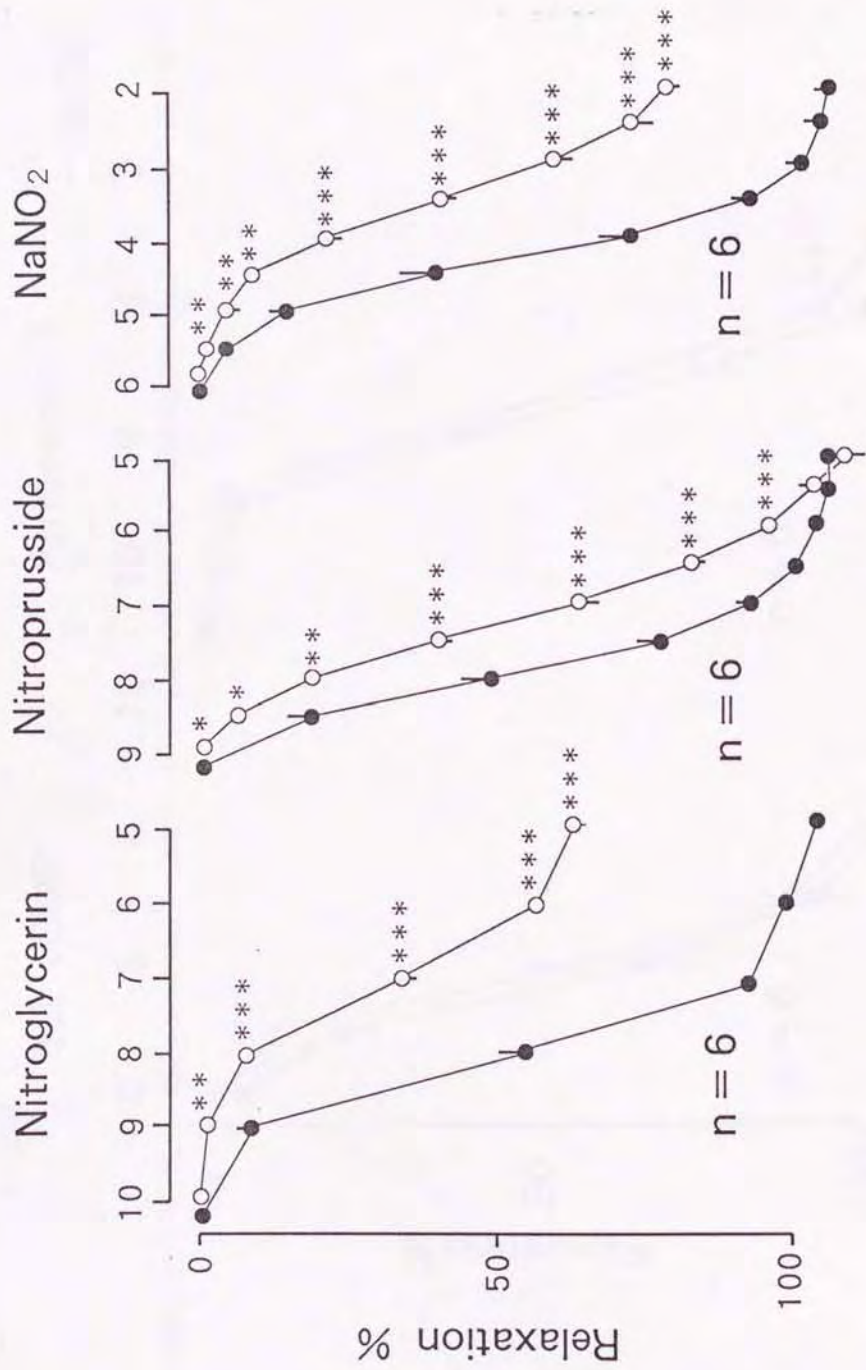


図 8

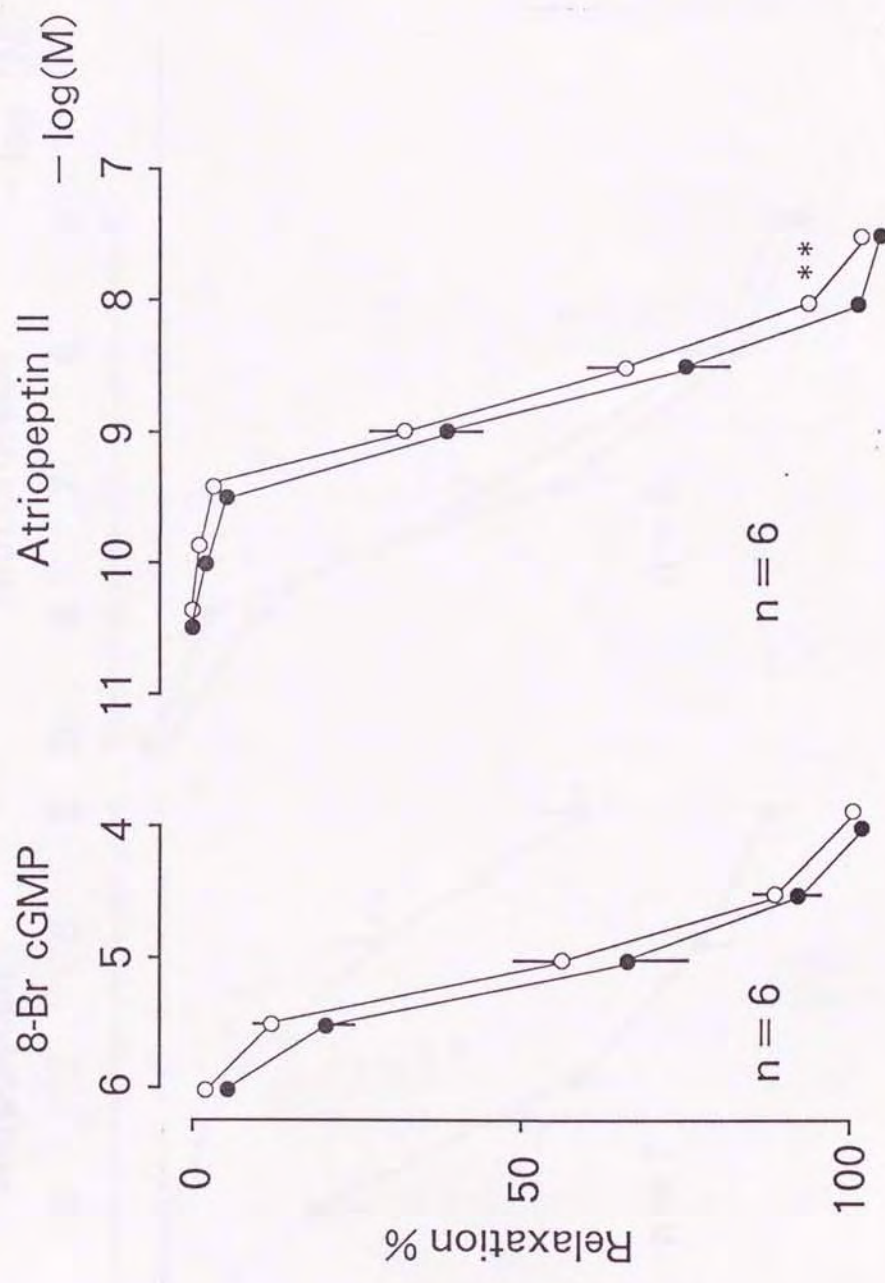
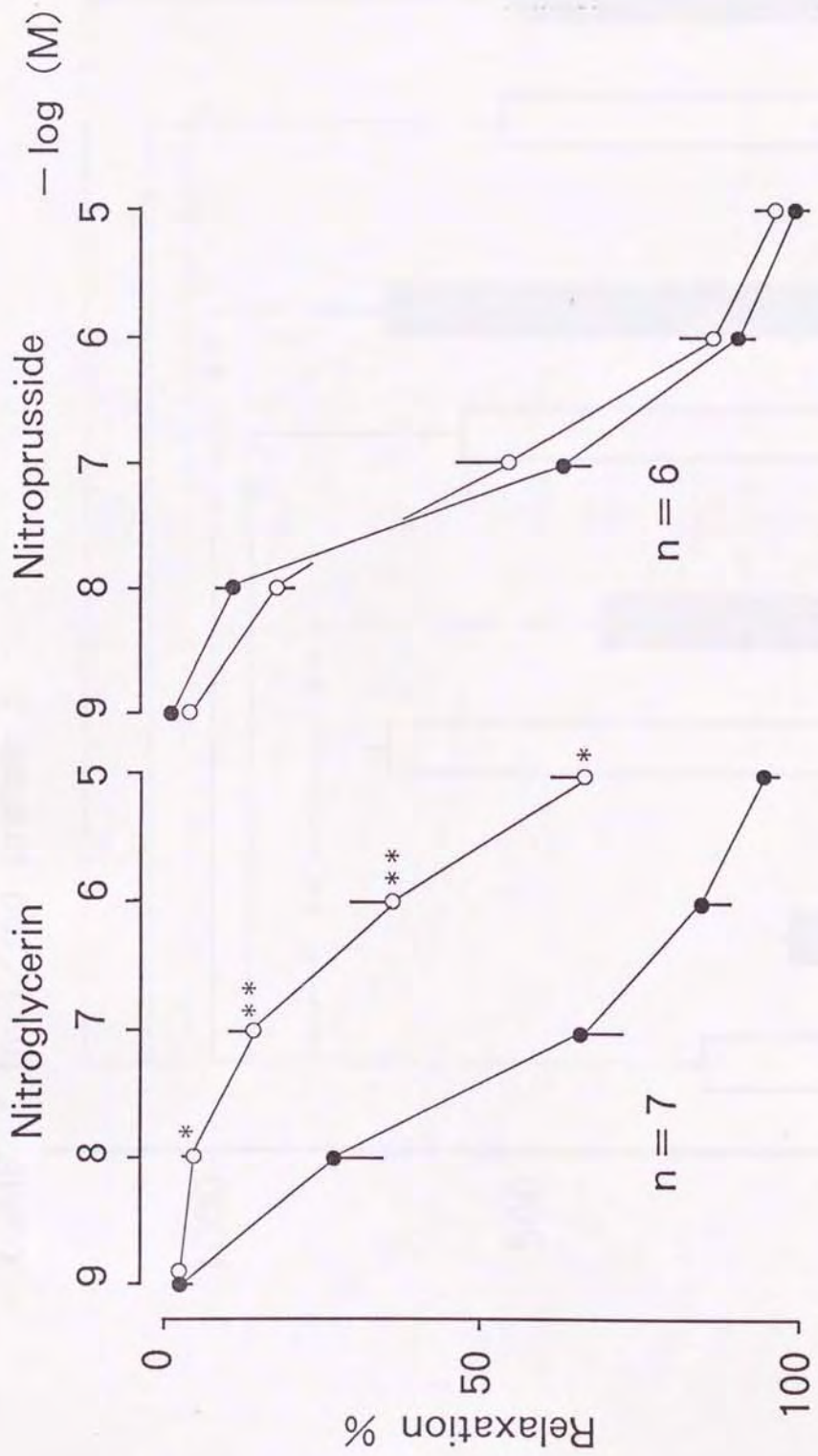


図 9



10 / 10



図 11

Abstract

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 NaNO_2 , 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 NaNO_2 was attenuated after 60min-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, NaNO_2 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 NaNO_2 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.