

福岡大学博士学位論文

ラットおよびマウス腸間膜動脈血管床における
血管機能調節機構の血管薬理学的研究

平成 27 年 3 月

藤原 弘喜

目次

要約	1
緒言	4
第一章 先天性インスリン抵抗性モデル Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット腸間膜動脈血管周囲神経の機能変化	
1. 目的	10
2. 実験材料および実験方法	11
2.1 実験動物	
2.2 血液生化学的検査値および空腹時血糖値の測定	
2.3 収縮期血圧および心拍数の測定	
2.4 ラット腸間膜動脈灌流標本の作製	
2.5 灌流圧測定	
2.6 血管周囲神経経壁電気刺激 (periarterial nerve stimulation; PNS)	
2.7 各種薬物の注入	
2.8 実験プロトコール	
2.9 統計学的解析	
2.10 使用薬物	
3. 結果	16
3.1 体重、摂食量、飲水量の変化	
3.2 血液生化学的变化	
3.3 収縮期血圧および心拍数	
3.4 PNS および noradrenaline による血管収縮反応の変化	
3.5 PNS および CGRP による血管弛緩反応の変化	
3.6 Acetylcholine および SNP による血管弛緩反応の変化	
4. 考察	23
5. 小括	26

第二章 マウス腸間膜動脈血管床を用いた灌流標本作製および神経性血管反応

1. 目的	27
2. 実験材料および実験方法	29
2.1 実験動物	
2.2 マウス腸間膜動脈灌流標本の作製	
2.3 灌流圧測定	
2.4 血管周囲神経経壁電気刺激 (periarterial nerve stimulation; PNS) および各種薬物の注入	
2.5 実験プロトコール	
2.5.1 至適灌流速度の検討	
2.5.2 PNS の至適強度の条件設定	
2.5.3 灌流圧上昇条件下における PNS および各種血管拡張薬物に対する血管 反応の検討	
2.5.4 Capsaicin 感受性神経伝達物質枯渇標本の作製および血管反応の検討	
2.5.5 免疫組織化学的検討	
2.6 統計学的解析	
2.7 使用薬物	
3. 結果	36
3.1 マウス腸間膜動脈血管床における至適灌流速度の決定	
3.2 PNS による血管収縮反応に対するパルス幅および tetrodotoxin の影響	
3.3 PNS による血管収縮反応に対する guanethidine の影響	
3.4 PNS および noradrenaline による血管収縮反応に対する prazosin の影響	
3.5 灌流圧上昇条件下における PNS および acetylcholine、SNP、CGRP によ る血管弛緩反応と tetrodotoxin の影響	
3.6 PNS および acetylcholine、SNP、CGRP による血管弛緩反応に対する capsaicin の影響	
3.7 PNS および CGRP による血管弛緩反応に対する CGRP8-37 の影響	
3.8 免疫組織化学	
4. 考察	48
5. 小括	52

第三章 マウス腸間膜動脈灌流標本における内皮依存性血管弛緩反応

1. 目的	54
2. 実験材料および実験方法	55
2.1 実験動物	
2.2 マウス腸間膜動脈灌流標本の作製	
2.3 灌流圧測定	
2.4 Acetylcholine および SNP、A23187 の注入	
2.5 化学的血管内皮機能喪失標本の作製	
2.6 実験プロトコール	
2.7 統計学的解析	
2.8 使用薬物	
3. 結果	58
3.1 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応と内皮機能喪失標本の影響	
3.2 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する L-NAME の影響	
3.3 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する indomethacin の影響	
3.4 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する tetraethylammonium (TEA) および glibenclamide の影響	
3.5 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する 18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA) の影響	
4. 考察	64
5. 小括	68
総括	70
参考文献	74

要約

腸間膜血管床は、抵抗血管を多く含む血管床であり、その血流の変化は全身血圧にも影響する。血管の緊張度は、主に血管収縮性の交感神経活動の増減によって調節されていることが知られている。しかしながら、腸間膜動脈を含む多くの血管が自律神経とは異なった非アドレナリン・非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic; NANC) 神経の神経支配を受けていることが明らかにされている。ラット腸間膜動脈では、NANC 神経の主要な神経伝達物質はカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) であり、CGRP 含有神経 (CGRPergic nerves) と呼ばれる。CGRP 含有神経は、交感神経とともに血管緊張を調節していることが明らかにされている。しかし、糖尿病や高血圧における血管周囲神経の機能については、エビデンスが十分ではない。15%フルクトースを飲水として長期間負荷することで人為的に糖尿病の前症状であるインスリン抵抗性を惹起させたモデルのフルクトース飲水負荷ラット (fructose drinking rats; FDR) の特徴として、インスリン抵抗性とともに高血圧を併発する。FDR の腸間膜動脈灌流標本を用いた研究では、交感神経機能の亢進、CGRP 含有神経機能の低下が引き起こされ、これが高血圧発症の一因であると報告されている。しかし、インスリン抵抗性の結果生じる高インスリン血症に長期間暴露された場合の血管機能調節機構の変化については十分に明らかにされていない。そこで、第一章では先天的にインスリン抵抗性を呈する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットを用いて血管周囲神経の機能変化について血管薬理学的に検討した。その結果、OLETF ラットでは、FDR と同様にインスリン抵抗性とともに高血圧を示し、その背景には交感神経機能の亢進あるいは CGRP 含有神経機能の低下、さらには血管内皮機能の低下が生じていた。加えて、加齢に伴う病態の進展もみられた。従って、インスリン抵抗性およびそれに伴う高インスリン血症により血管周囲神経機能変化が生じ、この変化が高血圧の進展に寄与していることが示唆された。

現在、マウスでも病態発現に関与する遺伝子を操作し、過剰発現あるいは欠損させた病態モデルが確立され、それらを用いて病理学的に血管周囲神経機能についての研究が行われている。しかし、マウスの血管は小さいために、大動脈などの大血管を用いた研究のみであり、血圧の維持に重要な腸間膜動脈を含む抵抗血管を用いた研究は少ない。そこで、第二章では、マウスにおける抵抗

血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、8~9 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを用いて灌流標本を作製し、灌流速度および経壁電気刺激 (PNS) の諸条件を検討した。加えて、ラット腸間膜動脈と同様に交感神経性および CGRP 含有神経性の血管反応が観察され、血管周囲神経支配が存在するか検討した。まず灌流速度を 1~5 mL/min に変化させ、その時の灌流圧変化を測定した。また、血管弛緩薬 papaverine 存在下、同様に灌流圧変化を測定した。さらに、各灌流速度において PNS を行い血管反応を観察した。その結果、灌流速度の上昇に伴い灌流圧も上昇した。しかし、4~5 mL/min 以上の流速では、灌流圧が上下に変動し不安定になった。Papaverine による灌流圧の更なる低下は観察されなかったため、静止緊張状態では血管が完全に拡張していることが確認できた。PNS による血管収縮反応は灌流速度の上昇に伴い増大したが、灌流速度が 3 mL/min の時に血管反応がより大きく安定して観察できた。また、パルス幅 30 μ sec の PNS により観察された血管収縮反応は、tetrodotoxin および guanethidine、prazosin 存在下で消失した。従って、マウス腸間膜動脈灌流標本の至適灌流速度は 3 mL/min、電気刺激強度はパルス幅 30 μ sec であると判断した。血管弛緩反応は、あらかじめ灌流圧を上昇させた後で PNS および各種作動薬による血管反応を観察した。Acetylcholine、sodium nitroprusside (SNP) により一過性の弛緩反応が、PNS および CGRP により持続した弛緩反応が観察できた。PNS による弛緩反応は、tetrodotoxin、CGRP8-37 存在下、capsaicin 処置した標本において消失した。さらに、マウス腸間膜動脈および静脈において、TH 免疫陽性線維および CGRP 免疫陽性線維が血管周囲を網目状に取り巻くように外膜層に分布していることが観察された。以上の結果より、マウス腸間膜動脈において血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、PNS によりこれら両神経を介する血管反応を観察できることが明らかとなり、ラットと同様に血管周囲神経が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第二章では、マウス腸間膜動脈における神経性の血管反応を示したが、血管内皮由来弛緩因子 (EDRF) の役割についてはほとんど明らかにされておらず、遺伝子操作した病態モデルマウスを用いて血管内皮機能を解析するためには、まだその機能についての報告が少なく十分ではない。そこで第三章では EDRF、特に内皮依存性過分極因子 (EDHF) について、内皮依存性弛緩反応を惹起させ

る acetylcholine および A23187 を用いて検討した。Sodium deoxycholate 処置により血管内皮機能を喪失させた標本において、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応はほぼ消失した。L-NAME (100 μ M) 存在下では、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応に変化が見られなかったのに対し、L-NAME (500 μ M) 存在下では有意に抑制された。Indomethacin 存在下では、A23187 による血管弛緩反応が有意に抑制された。Tetraethylammonium 存在下では、acetylcholine および A23187 による弛緩反応は有意に抑制された。Glibenclamide 存在下では、acetylcholine および A23187 による弛緩反応に影響はみられなかった。18 α -glycyrrhetic acid 存在下では、acetylcholine による弛緩反応が有意に抑制された。以上の結果より、マウス腸間膜動脈において、様々な刺激により血管内皮細胞から NO や prostanoids、EDHF などの異なる EDRF が遊離され、血管緊張度調節に寄与していることが示唆された。また、EDHF を介する弛緩反応は、K⁺ channel だけでなく gap-junction を介する経路もあり、ラットとは関係する EDHF が異なることも示唆された。

本研究の成果は、長期間インスリン抵抗性およびそれに伴う高インスリン血症では高血圧を示し、その背景には交感神経機能の亢進あるいは CGRP 含有神経機能の低下、血管内皮機能の低下が生じることで高血圧の進展に寄与していることを、生体内で大きな血管床であり全身血圧にも影響を与えるラット腸間膜動脈灌流標本において示唆したものである。さらに、遺伝子改変にて病態モデルを作成しやすいマウスでも同様な腸間膜動脈標本を作成することが可能であることを明らかにし、血管周囲神経の機能を評価するにあたり最適な灌流速度および血管周囲神経刺激の諸条件を設定して、評価系の確立に貢献したものである。さらに、マウス腸間膜動脈においても血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、また、血管内皮細胞から EDRF、K⁺ channel や gap-junction を介する EDHF が産生され、様々な因子が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである。今後も様々な病態モデルマウスを用いることで、より多くの疾患の解析や血管緊張度調節のメカニズムの解析に役立つと考えられる。

緒言

血管は、環状構造の器官であるが、全身に張り巡らされ、すべての細胞に血液を供給することで、その生命維持に重要な役割を果たしている。血管は、内膜（内腔）側の内皮細胞層、中膜側の血管平滑筋層、外膜側の結合組織層の三層構造からなり、中膜層の血管平滑筋の働きによって緊張度（収縮と拡張）が変化する。血管の緊張、すなわち血管平滑筋の働きは、主に外膜層に分布する血管周囲神経によって維持調節され、抵抗血管と呼ばれる細小動脈の緊張度が維持されることで全身血圧が維持され、組織血液量が調節されている。腸間膜血管床は、主に小腸領域に血液を供給する大きな血管床であるが、多くの抵抗血管を含むために、全身血圧への影響も大きい血管床でもある。また、同血管床は、腹腔内にあるために摘出が容易で、抵抗血管の機能を調べるための多くの血管研究に用いられている。Kawasakiら（1988）は、ラット腸間膜動脈血管床の灌流標本を用いて、血管緊張の神経性調節を行っている血管周囲神経の分布、機能および相互作用について明らかにしている。この腸間膜動脈の血管緊張度調節において、自律神経である交感神経は、神経性調節の主たる機能を担っている。交感神経は神経衝撃に応じて主要な伝達物質 noradrenaline を遊離し、この noradrenaline が血管平滑筋上の α_1 アドレナリン受容体を刺激することで血管を収縮させ血管緊張を維持していることが知られている（Kong *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995; Donoso *et al.*, 1997）。しかしながら、腸間膜動脈には自律神経である副交感神経（コリン作動性神経）の分布は確認されるが、緊張度調節には関与していないことが明らかにされている（Tanguscharit *et al.*, 2012）。一方、腸間膜動脈を含む多くの血管が自律神経とは異なった非アドレナリン・非コリン作動性（non-adrenergic non-cholinergic; NANC）神経の神経支配を受けていることが明らかにされている（Bevan *et al.*, 1987; Kawasaki *et al.*, 1988; Toda *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1996）。ラット腸間膜動脈では、NANC神経の主要な神経伝達物質としてカルシトニン遺伝子関連ペプチド（calcitonin gene-related peptide; CGRP）が知られており、CGRPを伝達物質とする神経はペプチド作動性神経に分類され、CGRP含有神経（CGRPergic nerves）と呼ばれる。交感神経およびNANC神経は、血管緊張の神経性調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされている（Fig. 1）。特に、腸間膜動脈では、血管収

縮性神経の交感神経と血管拡張性神経の CGRP 含有神経が相反的な神経調節を行っていることが知られている (Kawasaki *et al.*, 1990b)。すなわち、交感神経は CGRP 含有神経機能を抑制し、逆に、CGRP 含有神経は、交感神経機能を抑制することで、血管緊張を適正に調節していることが提唱されている (Fig. 1)。さらに高血圧や糖尿病などの生活習慣病では、血管周囲神経機能や分布が変化し、神経性調節が破綻することで血管緊張が変化し、血圧上昇等が起こる可能性が示唆されている (Kawasaki *et al.*, 1990a; Takatori *et al.*, 2013)。しかし、生活習慣病における血管周囲神経機能に関する研究は少ないのが現状である (Fig. 1)。

近年、Takatori ら (2006, 2008) は、糖尿病の前症状であるインスリン抵抗性についての研究で、血管周囲神経機能に関する興味深い報告をしている。Takatori らは、15%フルクトースを飲水として長期間負荷することで人為的・後天的にインスリン抵抗性を惹起させたモデルのフルクトース飲水負荷ラット (fructose drinking rats; FDR) を作製し、このモデルラットの腸間膜動脈における血管機能調節機構についての研究を行っている。FDR では、インスリン作用が低下する結果、インスリン分泌が促進して高インスリン血症となり、インスリン抵抗性が進展する。さらに、FDR の特徴として高血圧も併発する。インスリン抵抗性が進展した FDR の腸間膜動脈灌流標本を用いた研究では、交感神経機能亢進、CGRP 含有神経機能の低下が引き起こされ、これが高血圧発症の原因の一つであると報告されている (Jin *et al.*, 2010)。In vivo あるいは in vitro の研究においても高インスリン血症はアテローム生成を促進させて動脈硬化を惹起し、インスリン抵抗性が心血管疾患リスクに寄与するとされる (Grundy *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005; DeFronzo., 2006; Kashyap and DeFronzo., 2007)。従って、インスリンは循環器調節を担う内因性物質として重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、インスリン抵抗性の結果生じる高インスリン血症に長期間暴露された場合の血管機能調節機構の変化については十分に明らかにされていない。そこで本研究の第一章では、先天的にインスリン抵抗性および高インスリン血症を呈するインスリン抵抗性モデル OLETF ラットの腸間膜動脈血管床を用いて血管周囲交感神経および CGRP 含有神経性の血管反応について、対象動物である LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットと比較検討した。

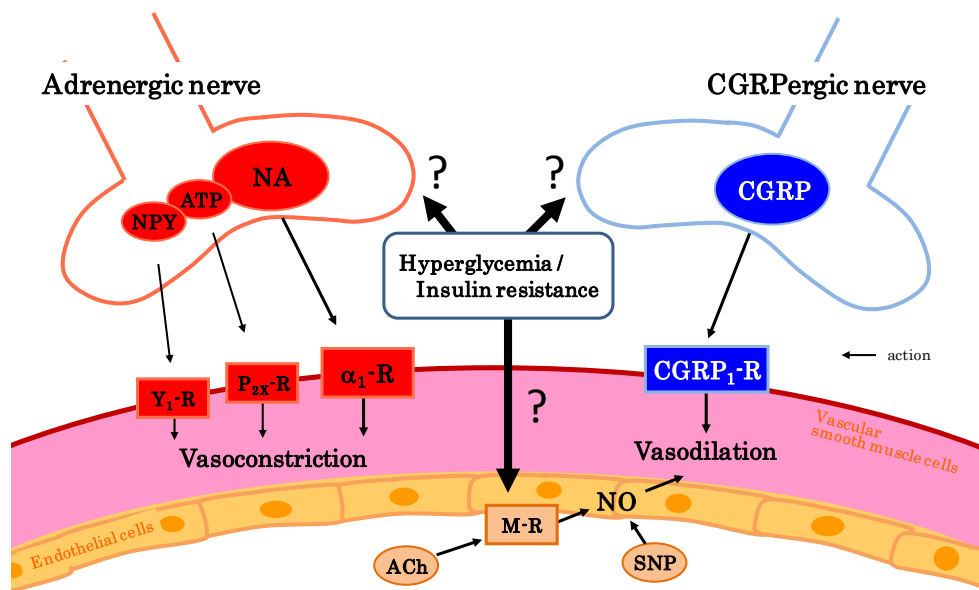


Fig. 1. Vascular tone control system of adrenergic and CGRPergic nerves and possible influences of chronic hyperglycemia and insulin resistance on adrenergic nerve-mediated vasoconstriction and CGRPergic nerve-mediated vasodilation. Abbreviations: NA, noradrenaline; ATP, adenosine 5'-triphosphate; NPY, neuropeptide Y; CGRP, calcitonin gene-related peptide; ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; NO, nitric oxide; α₁-R, α₁-adrenoceptor; M-R, muscarine receptor; -R, -receptor.

ラットを用いた病態モデルでは、その他にも、高血圧自然発症 (Kawasaki *et al.*, 1990a) や腎血管性高血圧 (Koyama *et al.*, 2009)、肥満 (Haddock and Hill, 2011) を呈する病態モデルラットおよび血管周囲神経を変性させたモデルラットを用いた血管調節機能についての研究も報告されている (Table 1)。しかしながら、ラット病態モデルは、その発症に長期間を要し、費用もかかるために多用されていない。一方、マウスでは病態発現に関与する遺伝子を操作し、過剰発現あるいは欠損させた病態モデルが確立され、それらを用いて病理学的に血管周囲神経機能についての研究が行われている (Table 1)。しかし、マウスの血管は小さいために大動脈などの大血管を用いた研究のみであり、血圧の維持に重要な腸間膜動脈を含む抵抗血管における神経性の血管緊張度調節についての報告は少ない。また、血管緊張度調節には、血管内皮細胞から産生・放出される血管内皮細胞由来弛緩因子 (endothelial-derived relaxing factor; EDRF) や血管内皮細胞由来収縮因子 (endothelial-derived constricting factor; EDCF) などの因子が、神経因子と同様に恒常性因子として血管緊張度調節を行っている (Fig. 3)。現在、主要な EDRF として、nitric oxide (NO) (Kelm *et al.*, 1988;

Palmer *et al.*, 1989)、prostaglandin I₂ (PGI₂) (Waldron and Cole, 1999)、endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Brandes *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2007) の3因子が同定されている。しかし、一般的に内皮依存する弛緩反応における EDRF の寄与は、動物種や血管径により異なることが知られている。EDHF 本体については、epoxyeicosatrienoic acid (Champbell *et al.*, 1996)、K⁺ イオン (Edwards *et al.*, 1998)、hydrogen peroxide (H₂O₂) (Pomposiello *et al.*, 1999) や内皮細胞と平滑筋細胞を繋ぐ gap-junction (Chaytor *et al.*, 2002; Griffith, 2004) を介する経路など幾つか報告されているものの、十分に明らかにされていない。そこで、本研究の第二章では、マウスにおける抵抗血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、マウス腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、灌流速度および経壁電気刺激 (PNS) の諸条件を検討した。さらに、ラット腸間膜動脈と同様に交感神経性および CGRP 含有神経性の血管反応が観察されるか検討した (Fig. 2)。加えて、遺伝子操作した病態モデルマウスを用いて血管内皮機能を解析するためには、まだその機能についての報告が少なく十分ではない。従って、本研究の第三章では、EDRF、特に EDHF について、内皮依存性弛緩反応を惹起させる acetylcholine および A23187 を用いて検討した (Fig. 3)。

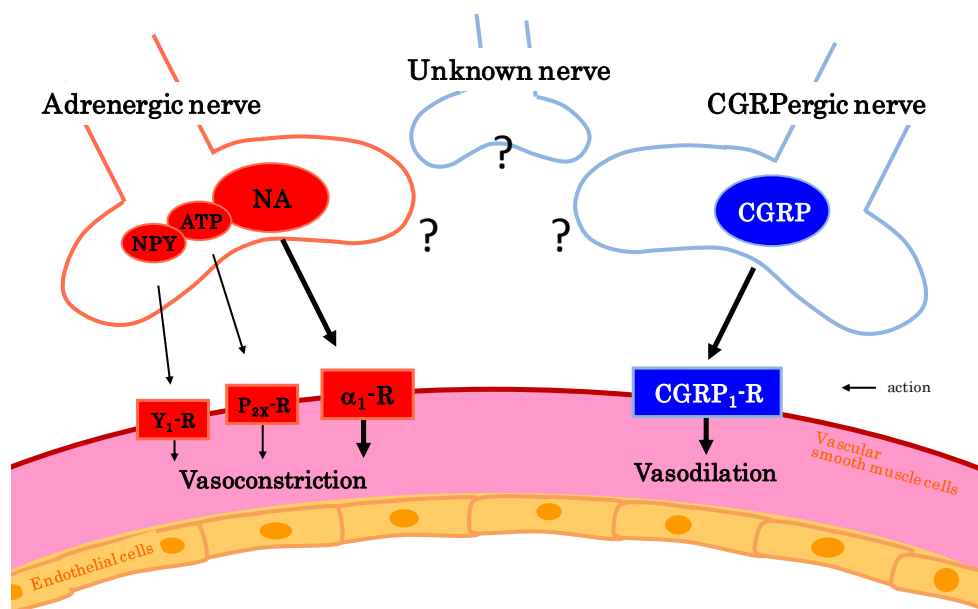


Fig. 2. Possible perivascular innervation and neurogenic control of vascular tone in male mouse perfused mesenteric vascular beds.
Abbreviations: NA, noradrenaline; ATP, adenosine 5'-triphosphate; NPY, neuropeptide Y; CGRP, calcitonin gene-related peptide; α₁-R, α₁-adrenoceptor; -R, -receptor.

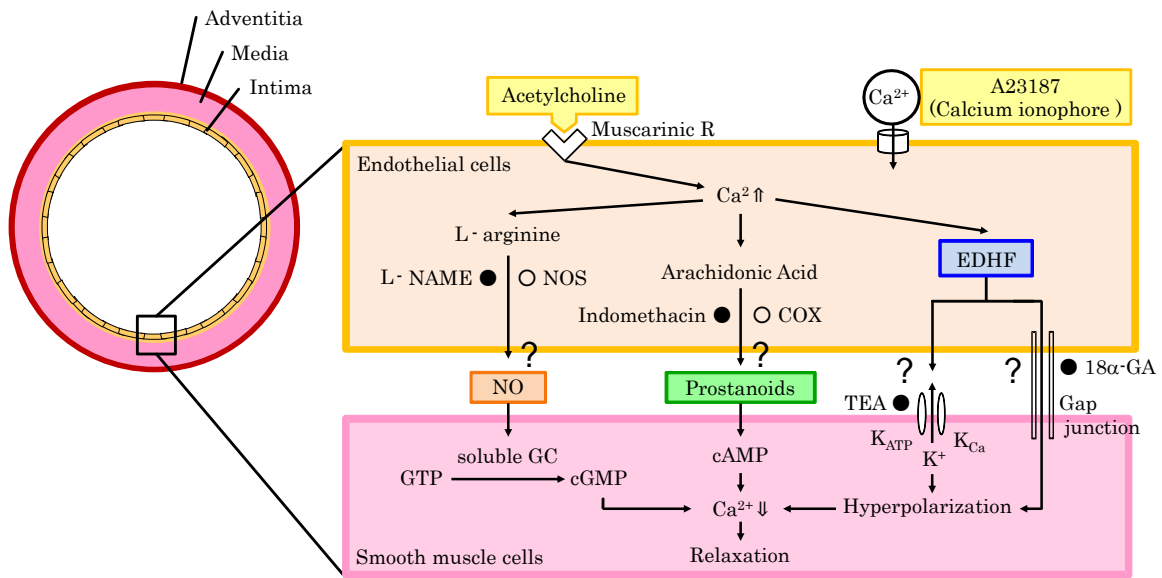


Fig. 3. Production, release and inhibition of endothelium-derived relaxing factors (EDRF) and possible mechanisms underlying acetylcholine- and A23187-induced endothelium-dependent vasodilation.

Abbreviations: ●, activation; ○, inhibition; Muscarinic R, muscarinic receptor; NO, nitric oxide; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; NOS, nitric oxide synthase; COX, cyclooxygenase; L-NAME, N_w-nitro-L-arginine methyl ester; TEA, tetraethylammonium; 18 α -GA, 18 α -glycyrrhetic acid; GC, guanylate cyclase; GTP, guanosine triphosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; K_{Ca}, calcium-activated potassium channel.

Table 1. Pathological animal model of rat and mouse for studies on vascular system.

Pathological model	Animals	Vascular system	Reference
Spontaneous Type2 Diabetes mellitus (OLETF)	Rat	Mesenteric vascular bed	Zamami <i>et al</i> (2010)
Artificial Type2 Diabetes mellitus (FDR)	Rat	Mesenteric vascular bed	Takatori <i>et al</i> (2006)
Spontaneous Hypertension (SHR)	Rat	Mesenteric vascular bed	Kawasaki <i>et al</i> (1990a)
Artificial Renal hypertension (2K-1C RHR)	Rat	Mesenteric vascular bed	Koyama <i>et al</i> (2009)
Artificial Obesity (feeding a high fat chow)	Rat	Mesenteric artery	Haddock and Hill (2011)
Artificial Hypertension (DOCA-salt HR)	Rat	Mesenteric vascular bed	Kawasaki <i>et al</i> (1990c)
Artificial Hypertension (Dahl-salt sensitive HR)	Rat	Carotid artery	Katki <i>et al</i> (2001)
All isoforms NOS knockout	Mouse	Blood pressure (Tail-cuff method)	Nakata <i>et al</i> (2008)
ApoE knockout	Mouse	Blood pressure (Tail-cuff method)	Jin <i>et al</i> (2012)
α CGRP knockout	Mouse	Aorta, mesenteric artery	Smillie <i>et al</i> (2014)
RAMP1 knockout	Mouse	Thoracic aorta	Tsujikawa <i>et al</i> (2007)
RAMP2 overexpression	Mouse	Thoracic aorta	Tam <i>et al</i> (2006)
ATP2B1 knockout	Mouse	Femoral artery	Kobayashi <i>et al</i> (2012)
Tsukuba hypertensive mice (carrying both human renin and human angiotensinogen genes)	Mouse	Blood pressure (Tail-cuff method)	Fukamizu <i>et al</i> (1993)

Abbreviations: OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty; FDR, fructose drinking rats; SHR, spontaneously hypertensive rats; 2K-1C, 2-kidney 1-clip renal hypertensive rats; DOCA, deoxycorticosterone acetate; HR, hypertensive rats; NOS, nitric oxide synthase; ApoE, apolipoprotein E; CGRP, calcitonin gene-related peptide; RAMP, receptor activity-modifying protein.

第一章

先天的インスリン抵抗性モデル Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラット腸間膜動脈血管周囲神経の機能変化

1. 目的

腸間膜血管床は、主に小腸領域と一部大腸領域に血液を供給する大きな血管床であるが、腹腔内にあるために、摘出が容易で多くの血管研究に用いられている。Kawasaki ら (1988) は、ラット腸間膜動脈血管床の灌流標本を用いて、血管緊張の神経性調節を行っている血管周囲神経の分布、機能および相互作用について明らかにしている。ラット腸間膜動脈血管における緊張度調節に関する研究では、自律神経である交感神経はアドレナリン作動性神経と呼ばれ、血管収縮性神経として緊張度調節の主たる機能を担っている。交感神経は、主に noradrenaline を伝達物質とし、血管平滑筋上の α_1 アドレナリン受容体を介して血管を収縮させ、血管緊張を維持している (Kong *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995; Donoso *et al.*, 1997)。しかしながら、ラット腸間膜動脈には自律神経の副交感神経であるコリン作動性神経の分布は存在するが、緊張度調節には関与していないことが明らかにされている (Tanguscharit *et al.*, 2012)。一方、腸間膜動脈を含む多くの血管が自律神経とは異なった非アドレナリン・非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic; NANC) 神経の神経支配を受けていることが明らかにされている (Bevan *et al.*, 1987; Kawasaki *et al.*, 1988; Toda *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1996)。ラット腸間膜動脈では、NANC 神経の主な神経伝達物質としてカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) が知られており、CGRP を伝達物質とする神経はペプチド作動性神経に分類され、CGRP 含有神経 (CGRPergic nerves) と呼ばれ、交感神経とともに血管緊張度調節に関与している。

Takatori ら (2006, 2008) は、後天的インスリン抵抗性モデルの一つとして 15%フルクトース溶液を飲水させてフルクトース飲水負荷ラット (fructose drinking rats; FDR) を作製し、このモデルラットの腸間膜動脈における血管機能調節機構についての研究を行っている。FDR では、インスリン作用が低下する結果、インスリン分泌が促進して高インスリン血症となり、インスリン抵抗性が進展する。さらに、FDR の特徴として高血圧も併発する。FDR の腸間膜動

脈灌流標本を用いた研究では、交感神経機能の亢進、CGRP 含有神経機能の低下が引き起こされ、これが高血圧発症の原因の一つであると報告されている (Jin *et al.*, 2010)。 *In vivo* あるいは *in vitro* の研究においても高インスリン血症はアテローム生成を促進させて動脈硬化を惹起し、インスリン抵抗性が心血管疾患リスクに寄与するとされる (Grundy *et al.*, 2002; Miranda *et al.*, 2005; DeFronzo., 2006; Kashyap and DeFronzo., 2007)。従って、インスリンは循環器調節を担う内因性物質として重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、インスリン抵抗性の結果生じる高インスリン血症に長期間暴露された場合の血管機能調節機構の変化については十分に明らかにされていない。そこで本研究では、先天的にインスリン抵抗性および高インスリン血症を呈するインスリン抵抗性モデル OLETF ラットの腸間膜動脈血管床を用いて血管周囲交感神経および CGRP 含有神経性の血管反応について検討し、対象動物である LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットと比較した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 実験動物

実験には、大塚製薬 (株) より提供された 6 週齢の OLETF ラットおよび比較対照ラットである LETO ラットを用いた。動物は、餌および飲料水を自由に与えた。飼育室は、室温を $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度を $50\% \pm 10\%$ に維持し、12 時間サイクル (点灯 ; AM8:00) に設定した。本研究は岡山大学動物実験ガイドラインに従って実施した。

2.2 血液生化学的検査値および空腹時血糖値の測定

血液検査および空腹時血糖値の測定は、8 および 25 週齢時、12 時間の絶食後の動物に、エーテル軽麻酔下で心臓穿刺を行い採血した。採血直後の一滴は直ちにアドバンテージ (ベーリンガー・ミュンヘン社製) を用いて血糖値を測定した。残りの血液は血液用遠心分離機で遠心処理を行い、血清サンプルとして -80°C で保存し、各種血液検査の測定に用いた。血清インスリン値は、インスリン測定キット (森永生化学研究所) を使用し、固相化インスリンモノクローナル抗体とモルモットインスリン抗体を用いた ELISA 法にて測定した。また、血清総コレステロール値および血清トリグリセリド値は、酵素法測定キット (和光

純薬社製) を用いて測定した。インスリン抵抗性の指標である Homeostasis Model Assessment Ratio (HOMA-R) 値は、 $\text{plasma glucose (mg/dL)} \times \text{insulin } (\mu\text{U/ml}) / 405$ の式で算出した。

2.3 収縮期血圧および心拍数の測定

収縮期血圧は、8 および 25 週齢時の LETO および OLETF ラットを無麻酔下に 37°C に保温した容器に 30 分間入れた後、小動物用血圧測定機 (Unicom 社製) に保持し、尾動脈の収縮期血圧を tail cuff plethysmograph 法にて測定した。測定時間は、午前 9~12 時の間に測定した。

2.4 ラット腸間膜動脈灌流標本の作製

LETO および OLETF ラットを pentobarbital-Na (50 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔して開腹後、腸間膜動脈血管床を摘出し、Kawasaki ら (1988) の方法に従いラット腸間膜動脈灌流標本を作製した。動物を背位に固定した後、腹部を正中線に開腹し、腹部大動脈から出る上腸間膜動脈領域を露出させた。上腸間膜動脈起始部を挟む大動脈の上下を結紮した後、大動脈を切開し、切開部位から上腸間膜動脈内にポリエチレン製カニューレを挿入した。直ちに、注射器にて Krebs-Ringer bicarbonate 液 (Krebs 液: 119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 0.03 mM EDTA-2Na, 11.0 mM glucose; pH 7.4) を注入して血管床内の血液を除去した。その後、腸管と腸間膜動脈血管床を一緒に摘出し、Krebs 液で満たしたシャーレ上に血管床を広げて固定した。上腸間膜動脈から分岐した主動脈のうち盲腸側から十二指腸側に数えて 4 本の主動脈を残し、それ以外の動脈を縫合糸にて結紮し切断した。なお、標本作製中には、動脈カニューレを通して Krebs 液を適宜注入し、組織損傷を防いだ。最後に 4 本の主動脈からでる動脈分岐を腸管側近くで切り離して、ラット腸間膜動脈血管床の灌流標本とした。

2.5 灌流圧測定

Fig. 4 に、本実験に用いた灌流圧測定装置の模式図を示した。灌流装置は、ペリスタルポンプ (Fig. 4A; model AC-2120, ATTO 製)、37°Cに保温した water jacket (Fig. 4F) および 37°Cに保温したガラス製蛇管 (Fig. 4G) から構成され、灌流圧測定装置は、圧トランスデューサー (Fig. 4B; model TP-400T, 日本光電製)、電気刺激装置 (Fig. 4C; model SEN-3301, 日本光電製)、圧測定アンプ (Fig. 4E; model AP-641G, 日本光電製) から成る。

作製した腸間膜動脈血管床標本は、water jacket 上に置いて加温し、標本に挿入したカニューレの一侧をガラス蛇管に接合して、Krebs 液をペリスタルポンプにて一定流量 (5 mL/min) で灌流した。Krebs 液にはあらかじめ 95%-O₂ および 5%-CO₂ の混合ガスを飽和させ、37°Cに保温したガラス製蛇管内 (Fig. 4G) を通過させ加温した。また、標本の外側に置いたカニューレを通して Krebs 液 (0.5 mL/min) を表面灌流し、標本の乾燥を防いだ。

圧トランスデューサー (Fig. 4B) を標本とポンプの間に連結し、これを介して灌流圧を測定した。灌流圧の変化は血管緊張度変化として測定し、圧測定アンプを通して増幅した後、記録計 (Fig. 4H; model U-228, 日本化薬製) 上に記録した。

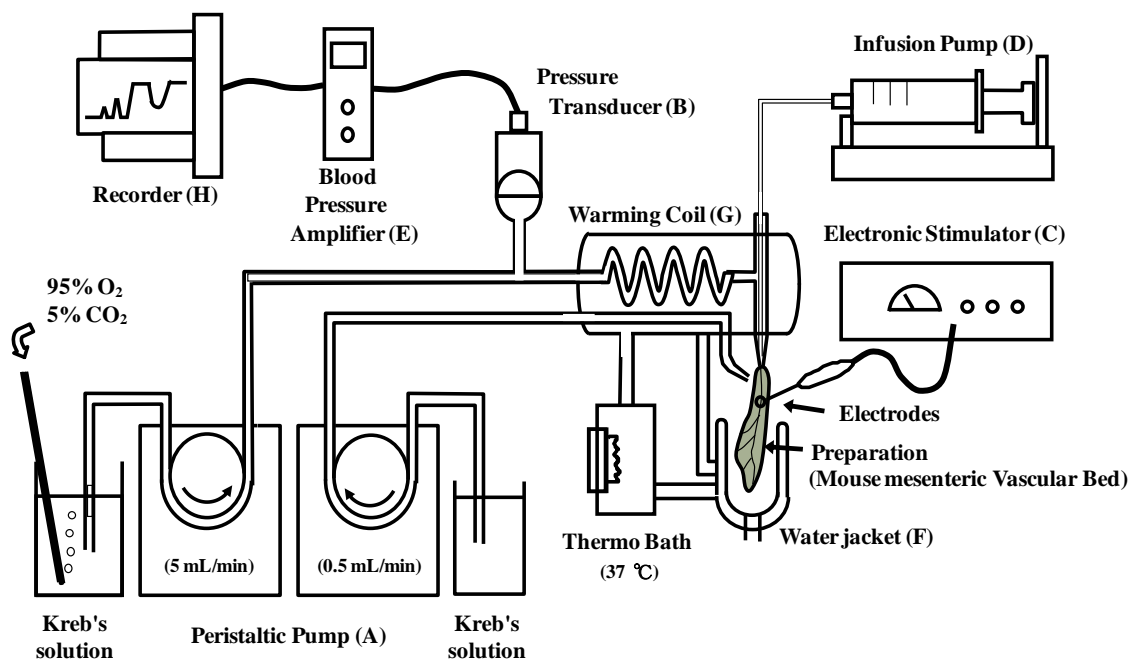


Fig. 4 Schematic drawing of perfusion of the rat mesenteric vascular bed. A; peristaltic pump, B; Pressure transducer, C; Electronic stimulator, D; Infusion pump, E; Blood pressure amplifier, F; Water jacket, G; Warming coil.

2.6 血管周囲神経経壁電気刺激 (periarterial nerve stimulation; PNS)

標本を灌流装置に設置後、上腸間膜動脈付近に先端をリング状にした白金電極を置いた。灌流圧が安定したのを確認後、電気刺激装置にて PNS を行った。刺激条件は電圧を 50 V、パルス幅を 1 msec に固定し、2~12 Hz の矩形波を 30 秒間通電した。

2.7 各種薬物の注入

静止緊張状態において、灌流圧が安定した後、注入ポンプ (Fig. 4D; model 975, HARVARD 社製) を用いて標本の動脈カニューレ付近の灌流液中に直接 noradrenaline (5, 10 nmol) を注入した (注入速度: 100 μ L/12 sec)。また、CGRP は、methoxamine (7 μ M) および guanethidine (5 μ M) を含む Krebs 液を灌流して血管を収縮させ、灌流圧を一定レベルにまで上昇させた後、noradrenaline と同様に注入した。Noradrenaline および CGRP は精製水で希釈し、注入時に灌流している Krebs 液と同じ組成の Krebs 液で最終濃度に用時調整した。

2.8 実験プロトコール

摘出した腸間膜動脈血管床を Krebs 液にて約 30 分間灌流後、灌流圧の安定を確認して、PNS (4, 8 および 12 Hz) および noradrenaline (5, 10 nmol) の注入を行い、灌流圧の上昇、すなわち血管収縮反応を観察した。その後、 α_1 -アドレナリン受容体作動薬である methoxamine (7 μ M) と交感神経の影響を除くために交感神経遮断薬である guanethidine (5 μ M) を加えた Krebs 液を灌流して、血管を収縮させて灌流圧を一定レベルまで上昇させた。灌流圧が安定した後、PNS (2, 4 および 8 Hz) による血管反応を調べた後、CGRP (25, 50, 100 pmol)、acetylcholine (ACh; 10, 50, 100 pmol) および sodium nitroprusside (SNP; 100, 1000 pmol) の注入を行い、灌流圧の下降、すなわち血管弛緩反応を観察した。実験の終わりに、血管弛緩薬 papaverine (100 μ M) を灌流して最大弛緩を求めた。血管収縮反応は灌流圧の上昇分 (Δ mmHg) で示し、血管弛緩反応では、papaverine による最大弛緩反応を 100 % として弛緩率 (%) で評価した。

2.9 統計学的解析

得られた実験値はすべて、平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で示した。統計学的解析は、一元配置の分散分析 (analysis of variance, ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行った。いずれも危険率は 5%以下を有意差ありと判定した。

2.10 使用薬物

第一章の実験には次の薬物を使用した； acetylcholine chloride (第一三共)、noradrenaline (第一三共)、guanethidine sulphate (Sigma-Aldrich Japan)、sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich Japan)、methoxamine hydrochloride (日本新薬)、papaverine hydrochloride (大日本住友製薬)、rat CGRP (ペプチド研究所)。Papaverine は Krebs 液にて希釈調整した。その他の試薬は、全て精製水にて溶解させ、Krebs 液にて希釈調整した。

3. 結果

3.1 体重、摂食量、飲水量の変化

8および25週齢OLETFラットの体重は、同週齢のLETOラットと比較して、いずれも有意に大きく、肥満を示した。OLETFラットは摂食量および飲水量の低下がみられたが、8週齢においてのみ有意な差が認められた (Table 2)。

3.2 血液生化学的变化

25週齢OLETFラットの血糖値は、同週齢のLETOラットと比較して有意に高値を示したが、8週齢では両群間の血糖値に差は認められなかった。一方、血清インスリン値は、8および25週齢LETOラットと比較してOLETFラットでは、8週齢では2倍、25週齢では8倍の高値を示した。血糖値と血清インスリン値から算出したインスリン抵抗性指数値 (HOMA-R) は、25週齢のOLETFラットでは、LETOラットと比較して10倍高い値を示し、著明なインスリン抵抗性が認められた (Table 2)。また、25週齢のOLETFラット群の血清総コレステロール値と中性脂肪値は、同週齢のLETOラットと比較して、有意に高い値を示した (Table 2)。

3.3 収縮期血圧および心拍数

Table 2 に示したように、OLETFラットの収縮期血圧値は、8週齢から25週齢の加齢に伴い増大し、同週齢のLETOラットと比較してもOLETFラットは有意に高く高血圧が認められた。一方、心拍数に関しては、両群間に差は認められず、また、週齢間にも差は認められなかった (資料未記載)。

3.4 PNS および noradrenaline による血管収縮反応の変化

静止緊張状態のLETOおよびOLETFラットの腸間膜動脈灌流標本においてPNS (4, 8 および 12 Hz) を行うと刺激頻度に依存した一過性の灌流圧上昇、すなわち血管収縮反応が観察された (Fig. 5a, 5b)。この灌流圧上昇は、刺激開始後すぐに始まり、30秒で最大に達し、刺激終了後にもとの灌流圧に復した。この血管収縮反応は、 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬 prazosin および交感神経遮断薬 guanethidine により消失するため、PNSによる収縮反応は交感神経終末から遊離される noradrenaline により生じるとされる。加えて、noradrenaline (5,

10 nmol) の注入によっても PNS の反応と同様な血管収縮反応が用量に依存して観察された (Fig. 5c, 5d)。Noradrenaline による収縮反応は prazosin により抑制されることから、シナプス後性の α_1 アドレナリン受容体を介していると考えられる。25 週齢の OLETF ラットでは、LETO ラットと比較して PNS (8, 12 Hz) による収縮反応が有意に増大した (Fig. 5b)。また、8 および 25 週齢の OLETF ラットでは、LETO ラットと比較して noradrenaline による収縮反応は有意に増大した (Fig. 5c, 5d)。

3.5 PNS および CGRP による血管弛緩反応の変化

Methoxamine および guanethidine を含む Krebs 液の灌流により、交感神経の影響を除いて灌流圧を上昇させた標本において、PNS (2, 4 および 8 Hz) により刺激頻度に依存した灌流圧の低下、すなわち血管弛緩反応が観察された (Fig. 6a, 6b)。弛緩反応は、刺激中から現れ、2~4 分で最大に達し、その後徐々に回復して 10~15 分で刺激前に復した。PNS による弛緩反応は、CGRP 受容体拮抗薬 CGRP8-37 存在下あるいは CGRP 枯渇標本において抑制されるため、CGRP 含有神経を介した反応であるとされる (Han *et al.*, 1990)。加えて、CGRP (25, 50 および 100 pmol) の注入によっても PNS の反応と類似した弛緩反応が用量に依存して観察された (Fig. 6c, 6d)。CGRP による弛緩反応はシナプス後性 CGRP 受容体を介していると考えられる (Nuki *et al.*, 1994)。PNS および CGRP による弛緩反応は、8 および 25 週齢の OLETF ラットでは、同週齢の LETO ラットと比較して有意に減弱していた (Fig. 6)。PNS および CGRP 注入前の平均灌流圧は、LETO および OLETF ラットで差は認められなかった (資料未記載)。

3.6 Acetylcholine および SNP による血管弛緩反応の変化

3.5 における実験と同様に、methoxamine および guanethidine を含む Krebs 液の灌流により交感神経の影響を除いて灌流圧を上昇させた標本において、acetylcholine (10, 50 および 100 pmol) および SNP (100, 1000 pmol) の注入により用量に依存した一過性の血管弛緩反応が観察された。これらの弛緩反応は、CGRP の注入で観察された持続的な弛緩反応とは異なり、注入後すぐに現れ、1 分以内で最大に達し、その後直ちに回復して 5 分以内で刺激前に復した。25 週齢の OLETF ラットでは、acetylcholine による弛緩反応が同週齢の LETO ラット

トと比較して有意に小さな値を示した (Fig. 7b)。一方、SNP による血管弛緩反応は、25 週齢の OLETF ラットにおいて、同週齢の LETO ラットと比較して 1000 pmol のみ有意に減弱した (Fig. 7d)。

Table 2. Changes in parameters in OLETF and LETO rats at 8 and 25 weeks of age.

	<i>8 weeks-old</i>	<i>25 weeks-old</i>
<i>Body weight (g)</i>		
LETO	244.7 ± 5.0	498.8 ± 4.8
OLETF	282.0 ± 4.0**	624.6 ± 7.5**
<i>Total food intake (g per week)</i>		
LETO	263.0 ± 28.6	250.8 ± 2.5
OLETF	206.3 ± 11.0	203.3 ± 10.00
<i>Total fluid intake (g per week)</i>		
LETO	166.3 ± 6.5	172.5 ± 9.1
OLETF	109.6 ± 16.3*	144.2 ± 7.5
<i>Blood glucose (mgdl⁻¹)</i>		
LETO	104.0 ± 2.9	138.0 ± 4.9
OLETF	109.5 ± 2.9	204.0 ± 6.3**
<i>Plasma insulin (μUml⁻¹)</i>		
LETO	6.6 ± 0.7	11.4 ± 2.2
OLETF	11.7 ± 2.1*	88.9 ± 0.7**
<i>HOMA-R</i>		
LETO	1.67 ± 0.1	3.9 ± 0.9
OLETF	3.1 ± 0.5	44.8 ± 4.6**
<i>Plasma total cholesterol (mgdl⁻¹)</i>		
LETO	77.8 ± 0.5	117.1 ± 1.4
OLETF	84.5 ± 4.7	123.4 ± 10.9**
<i>Plasma triglyceride (mgdl⁻¹)</i>		
LETO	50.9 ± 5.6	121.5 ± 32.9
OLETF	92.0 ± 3.6**	297.2 ± 17.6**
<i>Systolic blood pressure (mmHg)</i>		
LETO	120.6 ± 1.7	135.4 ± 1.5
OLETF	134.7 ± 2.4**	159.0 ± 2.5**

Abbreviations: HOMA-R, homeostasis model assessment ratio; LETO, Long-Evans Tokushima Otsuka rat; OLETF, Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty.

Values are expressed as the mean±s.e.m. from five to seven rats.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. age-matched LETO rats.

(Hypertens Res vol.37、p400 に投稿・掲載済)

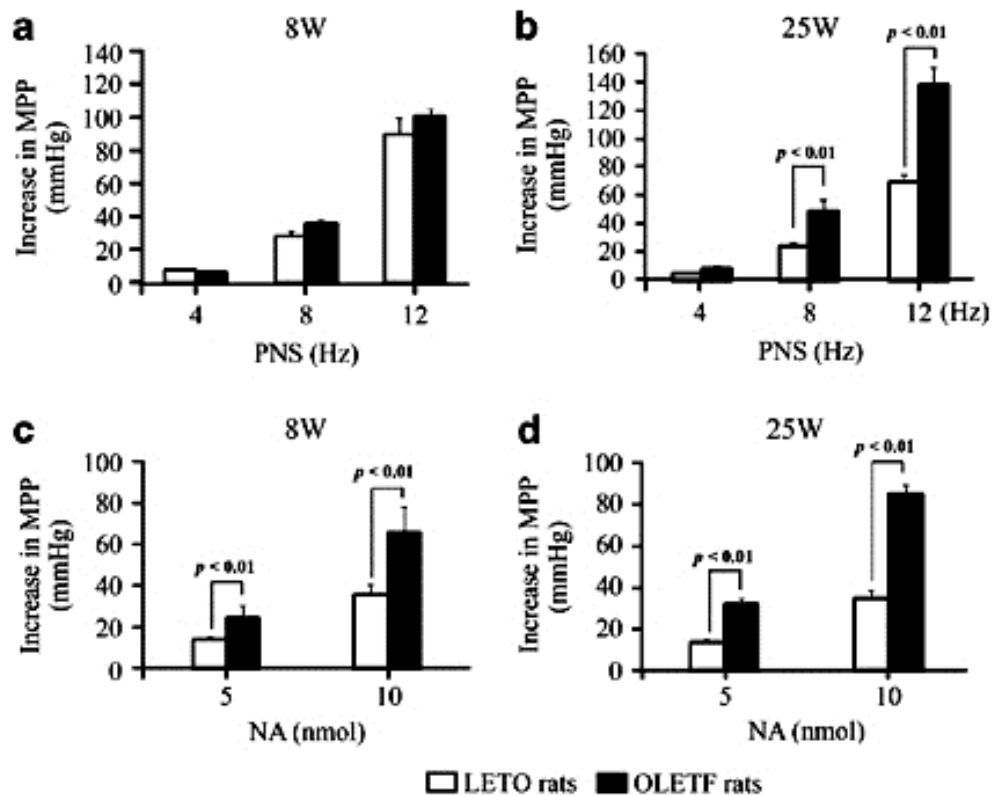


Fig. 5. Vasoconstrictor responses to perivascular nerve stimulation (PNS) (a and b; 4-12 Hz) and injections of noradrenaline (NA) (c and d; 5 and 10 nmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w; A and C) and 25 (25w; B and D) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. for four to five experiments. MPP, mean perfusion pressure.

(Hypertens Res vol.37、p401 に投稿・掲載済)

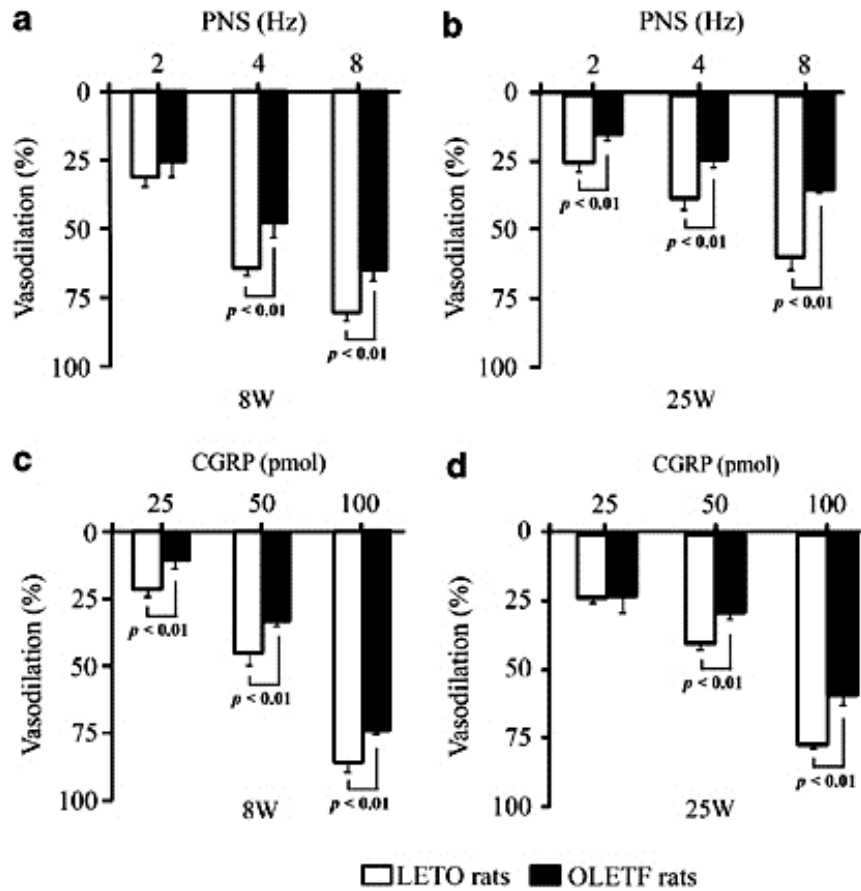


Fig. 6. Vasodilator responses to perivascular nerve stimulation (PNS) (a and b; 2-8 Hz) and injections of calcitonin gene-related peptide (CGRP) (c and d; 25-100 pmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w; A and C) and 25 (25w; Band D) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. for four to five experiments. (Hypertens Res vol.37、p402 に投稿・掲載済)

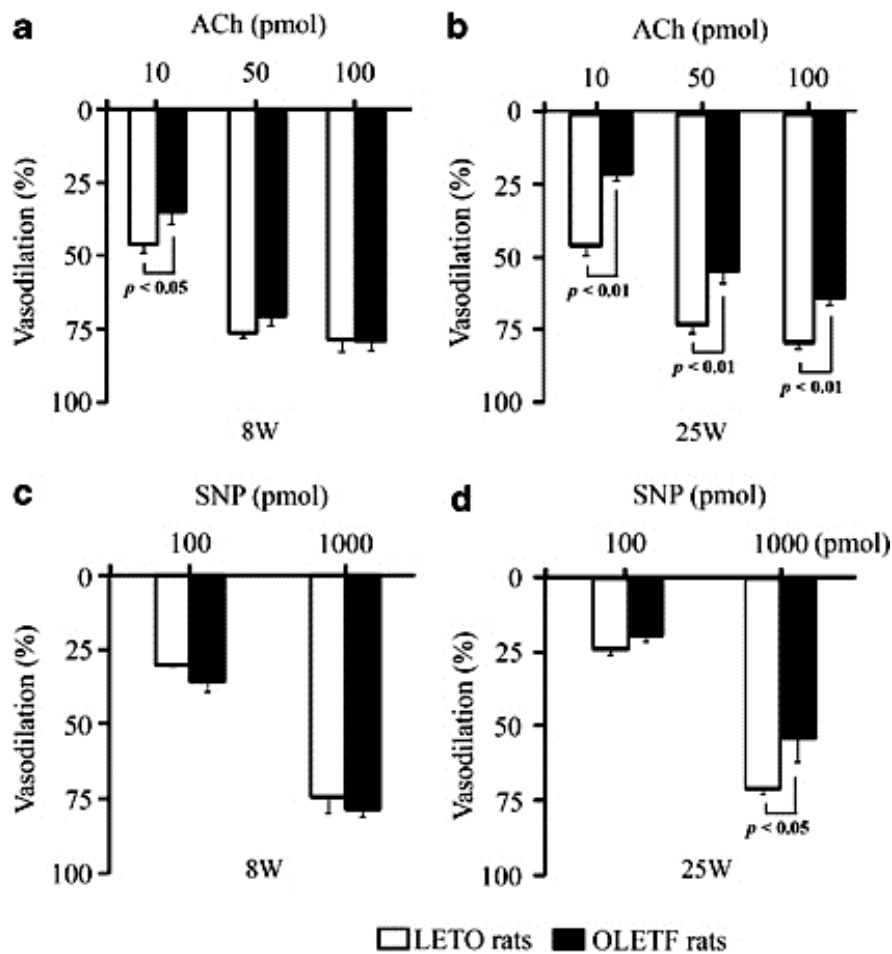


Fig. 7. Bar graphs showing vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh) (a and b; 10-100 pmol) and sodium nitroprusside (SNP) (c and d; 100 and 1000 pmol) in perfused mesenteric vascular beds isolated from Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) and Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats at 8 (8w) and 25 (25w) weeks of age. Open and closed bars indicate LETO rats and OLETF rats, respectively. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. for four to five experiments. (Hypertens Res vol.37、p403 に投稿・掲載済)

4. 考察

Takatori ら (2006, 2008) は、15%フルクトースを飲水として長期間負荷することで人為的にインスリン抵抗性を惹起させたモデルであるフルクトース飲水負荷ラット (fructose drinking rats; FDR) では、インスリン抵抗性ととも高血圧が起こることを見出した。この高血圧発症機序として、FDR では血管収縮性の交感神経機能が亢進するのに対して、交感神経機能を抑制する血管拡張性神経の CGRP 含有神経機能の低下が生じており、その結果、交感神経機能がさらに亢進して血管緊張が高まることで高血圧の進展に寄与していることを報告している。しかし、インスリン抵抗性により高インスリン血症に長期間暴露された場合の血管機能調節機構の変化については十分に明らかにされていない。そこで本研究では、先天性にインスリン抵抗性および高インスリン血症を呈する病態モデル OLETF ラットの腸間膜動脈血管床を用いて血管反応について検討した。

OLETF ラットの体重は、同週齢の LETO ラットと比較して有意に大きく、肥満を示した。同時に、OLETF ラットの血清インスリン値は LETO ラットの約 8 倍値を示し、著明な高インスリン血症が認められた。しかし、血糖値は OLETF ラットでは、LETO ラットと比較して有意に高値を示したが、その差は少ないことから、インスリンの作用が十分でないために、代償性のインスリン分泌が亢進して高インスリン血症になる結果、インスリン抵抗性が生じていることが推察される。事実、血糖値と血清インスリン値から算出したインスリン抵抗性指数値 (HOMA-R) は、25 週齢 OLETF ラットでは同週齢の LETO ラットと比較して 10 倍高い値を示していることから、著明なインスリン抵抗性が発症していることが伺える (Table 2)。

さらに、25 週齢 OLETF ラットの収縮期血圧値は、8 週齢群と比較して有意に上昇しており、インスリン抵抗性に伴う高血圧も併発していることが確認された。したがって、Takatori らが提唱しているように、OLETF ラットではインスリン抵抗性高血圧が起こると考えられる。

インスリン抵抗性高血圧の発症原因を明らかにする目的で、腸間膜動脈血管床を用いた灌流実験において、LETO ラットと比較して OLETF ラットでは、PNS による交感神経性の収縮反応が加齢に伴い有意に増大していた (Fig. 5)。一方で、CGRP 含有神経性の弛緩反応は同週齢の LETO ラットと比較して有意

に減弱していたが、加齢により弛緩反応はさらに減弱した (Fig. 6)。また、データには示していないが、LETO ラットと OLETF ラットでは、交感神経に属する NPY 免疫陽性神経の分布密度に差はなかったが、逆に CGRP 免疫陽性神経の分布密度は OLETF ラットにおいて有意に減少していた。Kawasaki ら (1990b) は、CGRP 含有神経は機能的に交感神経性の収縮反応を抑制し、CGRP 含有神経と交感神経は相反的に作用していることを報告している。従って、OLETF ラットでは、加齢に伴い CGRP 含有神経機能が減弱するために、結果的に交感神経機能が増大したと考えられる。

さらに、Zamami らは、実験的にインスリン抵抗性を発症させ、高インスリン血症と高血圧を呈する FDR では、CGRP 含有神経の分布や後根神経節 (DRG) の CGRP レベルが減少しており、これらの変化が神経性血管緊張度調節機構の異常を惹起し、高血圧が発症進展することを報告している (Zamami *et al.*, 2011)。また、FDR にインスリン抵抗性改善薬であるピオグリタゾン処置すると神経性の血管緊張度調節機能が改善することから (Takatori *et al.*, 2008)、インスリン抵抗性の発症が原因であると考えられている。臨床研究においても 2 型糖尿病は高血圧のリスクファクターであり (Skarfors *et al.*, 1991; Haffner *et al.*, 1992; Lissner *et al.*, 1992)、本研究におけるインスリン抵抗性高血圧の結果と一致する。従って、インスリン抵抗性や高インスリン血症を呈する OLETF ラットにおいて、加齢に伴う交感神経機能の亢進および高血圧の進展には、CGRP 含有神経の減少が大きく関与していることが示唆される。

In vitro において、インスリンは CGRP 受容体に作用し、ラット腸間膜動脈を弛緩させることが報告されている (Mimaki *et al.*, 1998)。加えて、CGRP 含有神経終末には抑制的な調節機能として、シナプス前性の CGRP 受容体が存在する (Nuki *et al.*, 1994)。急性あるいは慢性的な血中インスリン濃度の上昇が CGRP 含有神経終末からの CGRP 放出に抑制的に作用している可能性も考えられる。しかしながら、インスリンがシナプス前 CGRP 受容体に作用するかどうかはさらなる研究が必要であると考えられる。

血管内皮細胞依存的に作用する acetylcholine の弛緩反応は、8 および 25 週齢の LETO ラットと比較して OLETF ラットではともに減弱が認められた (Fig. 7a, 7b)。したがって、慢性的な高インスリン血症の暴露の結果、内皮細胞機能が障害されたと考えられる。実際、インスリン抵抗性を主とする 2 型糖尿病の

患者においても血管内皮機能の低下が報告されている (Meeking *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2006)。さらに、noradrenaline による血管収縮反応はLETO ラットと比較してOLETF ラットでは顕著に増大した (Fig. 5c, 5d)。内皮細胞は EDRF を放出することで血管収縮に対して抑制的に働いており (Jin *et al.*, 2008)、OLETF ラットでは内皮機能が一部に障害を受けたため収縮反応が増大したと考えられる。さらに、SNP による内皮非依存的な弛緩反応も、25 週齢の OLETF ラットでは減弱していた (Fig. 7d)。この結果は、OLETF ラットの血管では SNP の NO 供与能を含め、血管平滑筋の活動性が加齢により減弱したためと考えられる。

インスリン抵抗性あるいは高インスリン血症を呈する OLETF ラットにおいて、加齢に伴い交感神経を介する収縮反応は増強し、CGRP 含有神経を介する弛緩反応、内皮細胞を介する弛緩反応は減弱した (Fig. 8)。従って、インスリン抵抗性および、それに伴う高インスリン血症は、血管周囲神経および血管内皮細胞による血管緊張度調節機能に異常をきたし、高血圧症の進展に寄与していると考えられる (Fig. 8)。

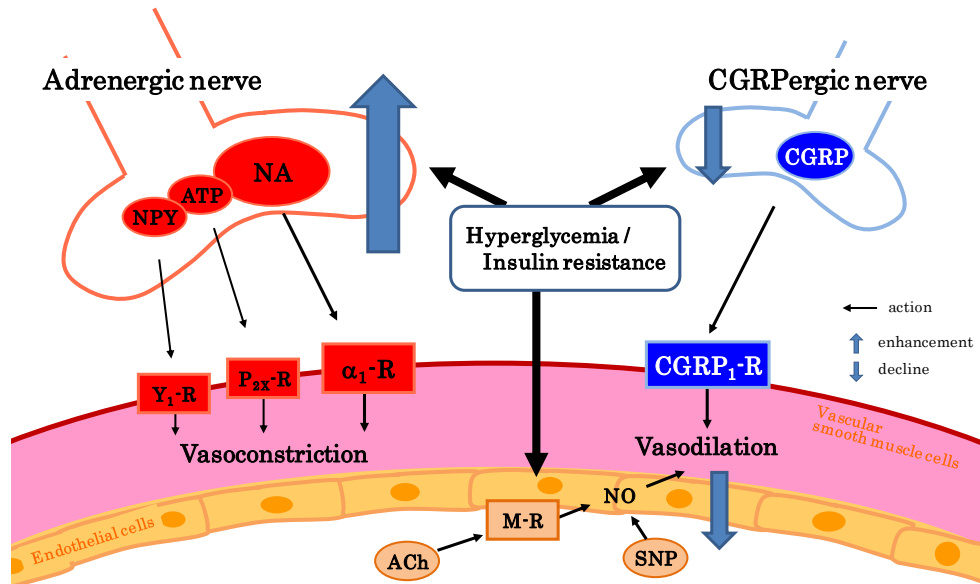


Fig. 8. Possible mechanisms underlying alteration of adrenergic-mediated vasoconstriction and CGRPergic-mediated vasodilation under chronic hyperglycemia and insulin resistance in perfused mesenteric vascular beds isolated from Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

Abbreviations: NA, noradrenaline; ATP, adenosine 5'-triphosphate; NPY, neuropeptide Y; CGRP, calcitonin gene-related peptide; ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; NO, nitric oxide; α₁-R, α₁-adrenoceptor; M-R, muscarine receptor; -R, -receptor.

5. 小括

第一章では、先天的にインスリン抵抗性や高インスリン血症を発症する OLETF ラットの腸間膜動脈血管床を用いて、血管周囲神経である交感神経および CGRP 含有神経の機能変化について検討した。

その結果、以下の知見が得られた。

1. 25 週齢 OLETF ラットでは、同週齢の LETO ラットと比較して、肥満、高血糖、高インスリン血症を呈し、HOMA-R では 10 倍以上のインスリン抵抗性を示した。
2. OLETF ラットの血圧値は加齢に伴い増大し、同週齢の LETO ラットと比較しても有意に高い血圧値を示した。
3. LETO ラットと比較して OLETF ラットでは、PNS による血管収縮反応は 25 週齢時において有意に増大した。また、noradrenaline による収縮反応は、8 および 25 週齢ともに OLETF ラットで有意に増大した。
4. PNS および CGRP による血管弛緩反応は、8 および 25 週齢ともに LETO ラットと比較して OLETF ラットで有意に減弱した。
5. Acetylcholine による血管弛緩反応は、25 週齢の OLETF において同週齢の LETO ラットと比較して有意に減弱した。一方、SNP による弛緩反応は、25 週齢の OLETF ラットにおいて同週齢の LETO ラットと比較して 1000 pmol のみ有意に小さな値を示した。

以上の結果より、後天的（実験的）インスリン抵抗性モデルである FDR と同様に先天的にインスリン抵抗性および高インスリン血症を発症する OLETF ラットも高血圧を発症し、その背景には、交感神経機能の亢進および CGRP 含有神経機能の低下、血管内皮機能の低下が生じていた。従って、高インスリン血症およびインスリン抵抗性が高血圧の進展に寄与していることが示唆される。

第二章

マウス腸間膜動脈血管床を用いた灌流標本作製および神経性血管反応

1. 目的

血管周囲に分布する交感神経は（血管支配神経、血管周囲神経）は、noradrenaline を主要な伝達物質とし、血管を緊張的に調節することで血圧の維持に大きく寄与している。交感神経の伝達物質は、その他にも、neuropeptide Y (NPY) や adenosin triphosphate (ATP) などが一部 cotransmitter として共存しており (Lundberg, 1996; Hobara *et al.*, 2006)、交感神経の刺激により noradrenaline とともに神経終末から放出される。ラット腸間膜動脈の血管周囲に交感神経が分布していることは、免疫組織化学的研究 (Kawamura *et al.*, 1989; Hobara *et al.*, 2006) および経壁電気刺激 (PNS) による神経刺激に対する血管収縮反応 (Nilsson *et al.*, 1986; Kawasaki *et al.*, 1988)、遊離 noradrenaline の測定 (Yamamoto *et al.*, 1994) により確認されている。一方で、交感神経とは異なる非アドレナリン・非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic) 神経の神経支配を受け、血管緊張度が調節されていることも明らかにされている (Kawasaki *et al.*, 1988; Toda *et al.*, 1990)。ラット腸間膜動脈において、経壁電気刺激により CGRP を伝達物質とする CGRP 含有神経を介して血管弛緩反応が生じること (Kawasaki *et al.*, 1988, 1990b)、免疫組織化学的研究 (Kawasaki *et al.*, 1988; Hobara *et al.*, 2006) により血管周囲に CGRP 神経が分布していることが確認されている。さらに、交感神経と CGRP 含有神経の血管緊張度調節機能について、インスリン抵抗性 (Takatori *et al.*, 2006) や自然発症高血圧 (Kawasaki *et al.*, 1990a)、腎血管性高血圧 (Koyama *et al.*, 2009)、肥満 (Haddock and Hill, 2011) を呈する病態モデルラットおよび血管周囲神経を変性させたモデルラットを用いた研究も報告されている。しかしながら、ラット病態モデルは、その発症に長期間を要し、費用もかかるため多用されていない。一方、マウスでは、病態発現に関与する遺伝子を操作し、過剰発現あるいは欠損させた病態モデルが確立され、それらを用いて病理学的に血管周囲神経機能についての研究が行われている。しかし、マウスの血管は小さいために、大動脈などの大血管を用いた研究のみである。血圧の維持に重要な血管は抵抗血管と呼ばれる細動脈や小動脈であるために、病態における抵抗血

管の緊張度変化をマウスモデルで研究することは不可能である。腸間膜動脈血管床の灌流標本は抵抗血管の緊張度変化や神経性の血管緊張度調節を調べることができるが、マウスにおける腸間膜動脈灌流標本についての報告は少ない。そこで本研究では、マウスにおける抵抗血管緊張度調節機構の研究を可能にするために、マウス腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、灌流速度および PNS の諸条件を検討した。加えて、ラット腸間膜動脈と同様に交感神経性および CGRP 含有神経性の血管反応が観察され、血管周囲神経支配が存在するか検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 実験動物

実験には、清水実験材料より購入した 8~9 週齢 (25~30g) の C57BL/6 系雄性マウスを用いた。動物には、餌および飲料水を自由に与えた。飼育室内は、室温を 22 °C ± 2 °C、相対湿度を 50 % ± 10 % に維持し、12 時間サイクル (点灯 ; AM8:00) に設定した。本研究は岡山大学動物実験ガイドラインに従って実施した。

2.2 マウス腸間膜動脈灌流標本の作製

マウスを pentobarbital-Na (50 mg/kg) の腹腔内投与により麻酔し、Kawasaki ら (1988) の方法に従いマウス腸間膜動脈灌流標本を作製した。マウスを背位に固定し、腹部正中線に沿って開腹後、上腸間膜動脈分岐部の腹部大動脈を露出した後剥離した (Fig. 9A)。腹部大動脈の心臓側を結紮後、大動脈に小切開を加え、切開部より上腸間膜動脈内にポリエチレン製カニューレ (外径 ; 0.78 mm 程度) を挿入した (Fig. 9B)。動脈カニューレは、ポリエチレンチューブ (外径 : 1.5 mm, 内径 : 0.2mm) の中央部を加熱し、両端を引っ張って加熱部を細くすることで作製した。直ちに Krebs-Ringer bicarbonate 液 (Krebs 液: 119.0 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.4 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25.0 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 0.03 mM EDTA-2Na, 11.1 mM glucose; pH7.4) を注入して血管床内の血液を除去したのち、腸管と腸間膜動脈血管床を一緒に摘出した。その後、ラット標本と同様に Krebs 液で満たしたシャーレ上に血管床を広げ (Fig. 10)、上腸間膜動脈から分岐した主動脈のうち盲腸側から十二指腸側に数えて 4 本の主動脈を残し、それ以外の動脈は結紮し切断した (Fig. 10)。なお、標本作製中には、動脈カニューレを通して Krebs 液をラット標本作製時よりもゆっくり且つこまめに注入し、組織損傷を防いだ。最後に 4 本の主動脈からなる動脈分岐を腸管側近くで切り離して、マウス腸間膜動脈血管床の灌流標本とした。

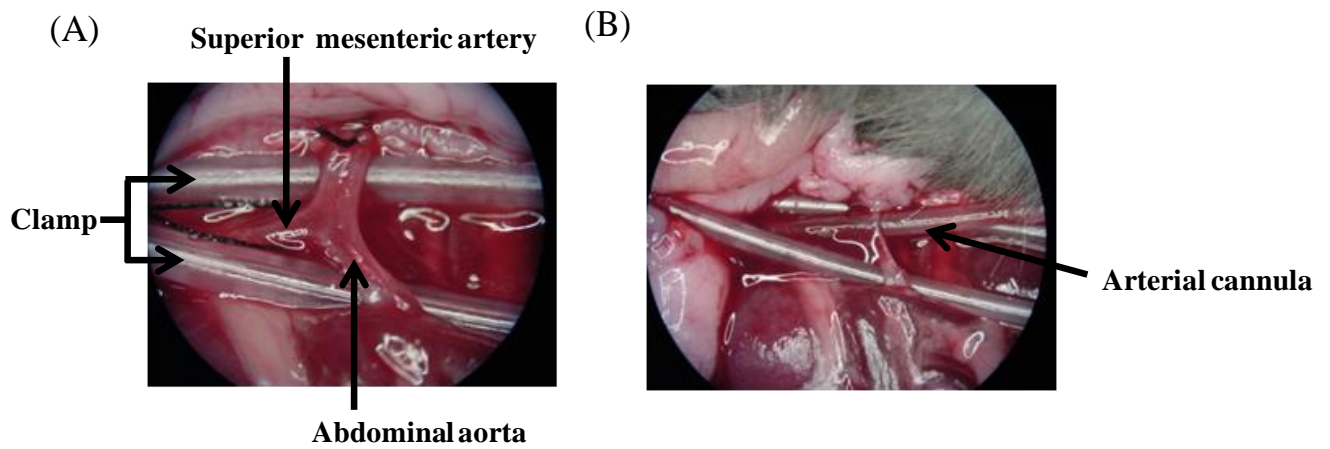


Fig. 9. Photographs showing isolation of abdominal aorta and cannulation into the superior mesenteric artery of the mouse. (A): isolation of the abdominal aorta at bifurcation of the superior mesenteric artery. (B): insertion of the arterial cannula into the superior mesenteric artery through the aorta.

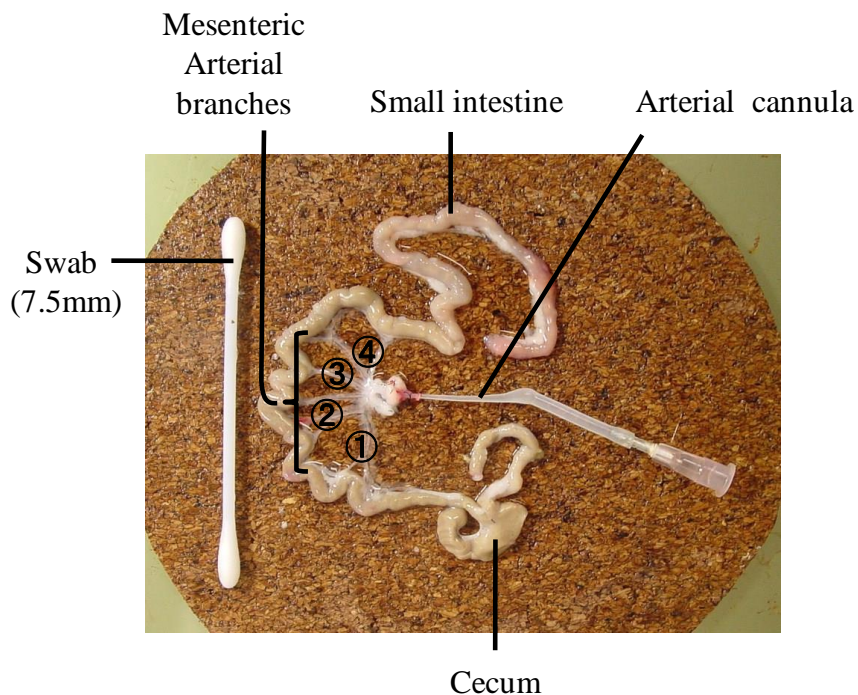


Fig. 10. A photograph showing preparing the mouse mesenteric vascular bed for perfusion. Only four main arterial branches (1 to 4) from the superior mesenteric trunk running to the terminal ileum were perfused. All other branches of the superior mesenteric artery were tied off, and the entire intestine and associated vascular bed were removed.

2.3 灌流圧測定

灌流装置および灌流圧測定装置は、ラット標本で用いた装置 (Fig. 4) と同じものを用いた。ただし、Krebs 液の灌流速度は、ペリスタルポンプの流速 (1~5 mL/min) を変化させることで設定した。

2.4 血管周囲神経経壁電気刺激 (periarterial nerve stimulation; PNS)

および各種薬物の注入

ラット標本で用いた白金電極の先端リングよりも小さくした電極を上腸間膜動脈付近に置き、電気刺激装置にて1~24 Hzの経壁電気刺激を行った (Fig. 11)。電気刺激矩形波の条件設定では、電圧を50 Vに固定し、パルス幅を10~50 μ secに変化させ、30秒間通電した。Noradrenaline、acetylcholine、sodium nitroprusside および CGRP は、標本の動脈カニューレ付近の灌流液中にインジェクションポンプにて直接注入した (注入速度: 60 μ L/12 sec)。電気刺激および各種作動薬の注入は、灌流圧が刺激前と同程度まで戻った後に行った。

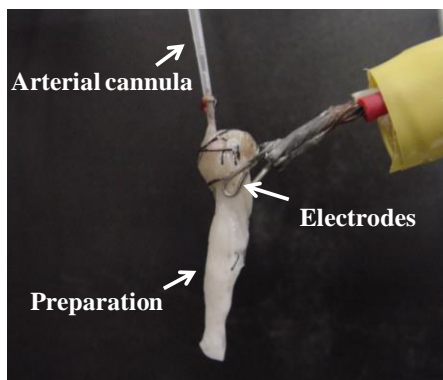


Fig. 11. A photograph showing experimental methods for periarterial nerve stimulation in the mouse mesenteric vascular bed. Bipolar platinum ring-electrodes were placed around the mesenteric vascular bed.

2.5 実験プロトコール

2.5.1 至適灌流速度の検討

灌流圧を安定させるために、標本を静止緊張状態で30分間灌流した。その後、灌流速度を1, 2, 3, 4, 5 mL/minに順次変化させ、各流速における灌流圧の変化を約30分間測定した。別の標本にて、灌流速度により血管緊張度に変化が生じていないかを確認する目的で、血管弛緩薬である papaverine (100 μ M) を含む Krebs 液を1, 2, 3, 4, 5 mL/minで順次変化させ、その時の灌流圧を測定した。

さらに、別の標本にて、血管反応性を検討するために、各流速において PNS (電圧; 50 V, パルス幅; 30 μ sec, 刺激頻度; 8, 12, 16, 20, 24 Hz) を行い、各灌流速度における PNS による灌流圧上昇 (血管収縮) 反応について検討した。

2.5.2 PNS の至適強度の条件設定

至適灌流速度の検討実験で、至適流速とした 3 mL/min に灌流速度を固定し、PNS のパルス幅 (pulse duration) を 10, 30, 50 μ sec に変化させ、各パルス幅における血管反応性を観察した。このとき、刺激電圧は 50 V、刺激頻度は 8~24 Hz に変化させた。さらに、PNS による血管反応が、神経性の反応かどうか確認するために、選択的な電位依存性 Na⁺ channel 阻害薬である tetrodotoxin (0.5 μ M) もしくは交感神経遮断薬である guanethidine (5 μ M) 存在下、同様の PNS を行い、血管反応の変化について検討した。加えて、PNS および noradrenaline の注入に対する α_1 アドレナリン受容体の影響について、 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬である prazosin (5 μ M) を用いて検討した。Tetrodotoxin および guanethidine、prazosin は、PNS および noradrenaline 注入の 10 分前から実験終了時まで灌流を行った。

2.5.3 灌流圧上昇条件下における PNS および各種血管拡張薬物に対する血管反応の検討

PNS やアドレナリン受容体作動薬による交感神経の興奮がない静止緊張状態では、灌流標本は血管が十分に拡張しているため血管拡張反応を観察できない。そこで、血管をあらかじめ収縮させ灌流圧を一定レベルにまで上昇させるために methoxamine (7 μ M) を加えた、また、交感神経の影響を除くために guanethidine (5 μ M) を加えた Krebs 液を持続的に灌流した。灌流圧が安定した後、PNS および acetylcholine (ACh; 1 nmol)、sodium nitroprusside (SNP; 10 nmol)、CGRP (5, 10 pmol) を注入した。PNS による血管反応が神経性かどうかを確認するために、methoxamine (7 μ M) および guanethidine (5 μ M)、tetrodotoxin (0.5 μ M) を含む Krebs 液の存在下、PNS および acetylcholine、sodium nitroprusside、CGRP の注入を行った。Tetrodotoxin は、PNS および各種血管拡張薬物注入の 10 分前から実験終了時まで灌流を行った。

別の標本にて、PNS に対する CGRP₁ 受容体の影響について、CGRP₁ 受容体拮抗薬である CGRP8-37 を用いて検討した。1 回目の PNS および CGRP の注入をコントロールとして観察した後、methoxamine (7 μ M) および guanethidine (5 μ M)、CGRP8-37 (1 μ M) を含む Krebs 液に切り替え、10 分間灌流した。その後、2 回目の PNS および CGRP 注入を行った。

実験の終わりに、血管弛緩薬 papaverine (100 μ M) を灌流して最大弛緩を求めた。血管収縮反応は灌流圧の上昇分 (Δ mmHg) で示し、血管弛緩反応では、papaverine による最大弛緩反応を 100 %として弛緩率 (%) で評価した。

2.5.4 Capsaicin 感受性神経伝達物質枯渇標本の作製および血管反応の検討

Capsaicin は、高濃度を暴露すると CGRP 含有神経から CGRP を大量に放出させて枯渇を起こし、神経機能を喪失させる。そこで、Kawasaki ら (Kawasaki *et al.*, 1988; Takenaga and Kawasaki, 1999) の方法を参考にし、*in vitro* で、capsaicin 用いて摘出マウス腸間膜動脈灌流標本の CGRP 含有神経の伝達物質である CGRP を枯渇させることで、その神経機能を喪失させた。まず、静止緊張状態下の標本に capsaicin (10 μ M) を含む Krebs 液を 30 分間灌流し、その後 capsaicin を含まない Krebs 液に切り替えてを 30 分間灌流して洗浄した。次に、methoxamine (7 μ M) および guanethidine (5 μ M) を含む Krebs 液に置換し、灌流圧を一定レベルにまで上昇させた後、PNS および acetylcholine、sodium nitroprusside、CGRP の注入を行った。

2.5.5 免疫組織化学的検討

マウスを pentobarbital-Na の腹腔内投与で麻酔し、開腹後、腹部大動脈を剥離し、上腸間膜動脈から Zamboni 液を注入した。その後、Hobara ら(2004, 2006)の方法に従い、腸管を含む腸間膜動脈血管床を摘出した。第 2 分岐もしくは第 3 分岐の腸管に近い腸間膜動脈および静脈のみを剥離して切り離し、組織標本とした。標本を Zamboni 液により室温で 48 時間浸潤固定を行い、その後、phosphate buffer saline (PBS, pH7.2 組成は後述) を用いて 1 時間間隔で 3 回洗浄した。次に、0.5% Triton-X 100/ PBS に約 48 時間浸潤し、再び PBS で 15 分間 2 回洗浄を行った後、正常ヤギ血清 (1: 100) 中に室温で 1 時間処置した。続いて、ウサギ抗 tyrosine hydroxylase (TH) ポリクローナル IgG (1: 500) (Chemicon international, Inc., Temecula, CA, USA)、あるいはモルモット抗 CGRP ポリクローナル抗血清 (1: 100) (American Research Products, Inc., Belmont, MA, USA) にて 4°C で 72 時間の処置を行った。次に標本を PBS で洗浄した後、Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗モルモット IgG (1: 200) あるいは、Alexa Fluor 555 標識ヤギ抗ウサギ IgG (1: 1000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に

て遮光条件下で 1 時間の抗原抗体反応を行った。さらに、PBS にて標本を完全に洗浄を行った後、標本をスライドガラス上に置き、グリセリン/PBS (2: 1 v/v) にて封入した。標本の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal laser scanning microscopy, CLSM510, Carl Zeiss 社製) を用いて観察を行った。画像と取り込む際、接眼レンズは 10 倍、対物レンズは 40 倍を使用し、pinhole は 1.00 と設定し、gain または offset はコントラストが最良となる位置に設定した。

別の標本にて、交感神経毒 6-hydroxydopamine (6-OHDA) 処置 (Zhang *et al.*, 1998) を行い、交感神経を化学的に除神経した。交感神経の除神経は、摘出した標本を 6-OHDA (4 mM) と glutathione (40 μ M) を含む Krebs 液に浸して 30 分間処置を行い、続いて Krebs 液のみで 30 分間洗浄処置した後、再度 6-OHDA (4 mM) と glutathione (40 μ M) を含む Krebs 液に浸して 30 分間処置することで行った。除神経処置後、細小動脈を単離し、Zamboni 液で浸潤固定した。以後は、TH の免疫組織化学的方法に従い、標本の蛍光を観察した。人為的あるいは偽免疫陽性反応を避けるために、コントロールとして二次抗体のみでの免疫染色も行ったが、免疫陽性線維は観察されなかった。

また、別の標本にて、2.5.4 で述べた方法で、capsaicin (40 μ M) を含む Krebs 液で 30 分間の灌流処置を行い、CGRP 含有神経を化学的に除神経した (Kawasaki *et al.*, 1988, 1990a)。続いて、capsaicin を含まない Krebs 液で洗浄した後、細小動脈を単離し、Zamboni 液で浸潤固定した。以後は、CGRP の免疫組織化学的方法に従い、標本の蛍光を観察した。

免疫染色は少なくとも各 3 例以上で観察した。

2.6 統計学的解析

得られた実験値はすべて、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.M.) で示した。統計学的解析は、同じ標本での 2 群間比較には対応のある Student's *t* 検定、異なる標本での 2 群間比較には対応のない Student's *t* 検定を用いた。また、多群間の比較では、一元配置の分散分析 (analysis of variance, ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定法、あるいは、二元配置の分散分析 (analysis of variance, ANOVA) 後、Bonferroni の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行った。いずれも危険率は 5%以下を有意差ありと判定した。

2.7 使用薬物

第二章の実験には以下の薬物を使用した。

acetylcholine chloride (第一三共)、noradrenaline (第一三共)、tetrodotoxin (第一三共)、capsaicin (Sigma-Aldrich Japan)、glutathione (Sigma-Aldrich Japan)、guanethidine sulphate (Sigma-Aldrich Japan)、6-OHDA hydrobromide (Sigma-Aldrich Japan)、prazosin (Sigma-Aldrich Japan)、sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich Japan)、CGRP(ペプチド研究所)、CGRP8-37 (ペプチド研究所)、methoxamine hydrochloride (日本新薬)、papaverine hydrochloride (大日本住友製薬)。Capsaicin 以外の薬物は、全て精製水にて溶解させ、Krebs 液にて最終希釈濃度に調整した。Papaverine は Krebs 液にて希釈調整した。Capsaicin は、50%エタノール溶液にて溶解させ、Krebs 液にて希釈調整した。Acetylcholine、sodium nitroprusside および CGRP は、注入時に灌流している Krebs 液と同じ組成の Krebs 液で最終濃度に用時調整した。

3. 結果

3.1 マウス腸間膜動脈血管床における至適灌流速度の決定

Fig. 12A および B に示すように、灌流速度を 1~5 mL/min に上昇させると、それに伴い平均灌流圧が上昇した。4 mL/min および 5 mL/min の流速では、何も刺激がない状態においても灌流圧が上下に変動し不安定な状態が観察された。各灌流速度において、PNS (電圧; 50 V, パルス幅; 30 μ sec, 刺激頻度; 8~24 Hz) を行うと、血管収縮反応に起因する灌流圧の上昇が刺激頻度に依存して観察された (Fig. 12A, 12C)。さらに、灌流速度の上昇に伴い、これらの収縮反応も増大した。しかし、3 mL/min 以上の灌流速度では、PNS による血管反応は、各流速においても同じ程度であり変化は認められなかった (Fig. 12C)。従って、マウス腸間膜動脈灌流標本において血管反応を観察する至適灌流速度は、3 mL/min であると判断した。

灌流速度によって血管緊張が増大しているかどうかを検討するために、血管弛緩薬 papaverine (100 μ M) 含む Krebs を灌流して灌流圧の変化を測定した。Table 3 に示したように、1~5 mL/min の灌流速度で papaverine を含む Krebs 液を灌流しても、平均灌流圧は papaverine 非存在下と比較して同じ程度であり、影響はみられなかった。

3.2 PNS による血管収縮反応に対するパルス幅および tetrodotoxin の影響

PNS の至適強度 (パルス幅) を設定するために、電圧 50 V で、刺激頻度 8~24 Hz を変化させて血管収縮反応の程度を検討した。パルス幅 10 μ sec の PNS では各刺激頻度の血管収縮反応は小さかったが、パルス幅 30 および 50 μ sec では、各刺激頻度の反応はパルス幅に依存して増大した (Fig. 13A, 13B, 13C)。

神経毒である tetrodotoxin (0.5 μ M) を用いて、各パルス幅による収縮反応が神経性であるかを検討した結果、tetrodotoxin 存在下では、パルス幅 30 μ sec の PNS による反応は消失したが、パルス幅 50 μ sec のより強い PNS では、小さな灌流圧の上昇が観察され、収縮反応は完全には消失しなかった (Fig. 13D, 13E)。従って、神経性の血管反応を観察するための PNS の条件は、パルス幅 30 μ sec が最適であると判断した。

3.3 PNSによる血管収縮反応に対する guanethidine の影響

交感神経遮断薬である guanethidine を用いて、PNS により誘発される血管収縮反応が交感神経に関与しているか検討した。その結果、パルス幅 30 μsec の PNS (電圧 50 V, 刺激頻度 8~24 Hz) による血管収縮反応は、guanethidine (5 μM) 存在下で消失した (Fig. 14)。しかしながら、パルス幅 50 μsec の PNS では消失せず残存し、データに示していないが、その残存した収縮反応は、10 μM の guanethidine 存在下でも小さな収縮反応が観察された。

3.4 PNS および noradrenaline による血管収縮反応に対する prazosin の影響

PNSによる血管収縮反応は、prazosin (5 μM) 存在下に著明に抑制されたが、完全には消失しなかった (Fig. 15B)。一方、noradrenaline の注入により用量に依存した収縮反応が観察された。また、noradrenaline を含まない Krebs 液のみの注入によってもわずかに灌流圧の上昇が観察された (Fig. 15A, 15C)。これは灌流液中に直接液を注入するために生じた圧変化と考えられる。Prazosin 存在下における noradrenaline 注入による収縮反応は、著明に抑制され、prazosin 存在下に Krebs 液のみの注入時の圧変化と同程度であった。従って、完全に収縮反応が消失した。

3.5 灌流圧上昇条件下における PNS および acetylcholine、SNP、CGRP による血管弛緩反応と tetrodotoxin の影響

血管弛緩反応を観察するために、 α_1 アドレナリン受容体作動薬である methoxamine (7 μM) および交感神経の影響を除くために guanethidine (5 μM) を加えた Krebs 液を灌流して血管を収縮させ灌流圧を一定レベルにまで上昇させた。Acetylcholine (1 nmol) および SNP (10 nmol) の注入により、血管弛緩反応に起因する一過性で反応時間の短い灌流圧の下降が観察された (Fig. 16A)。これらの反応から、マウス腸間膜動脈血管床に血管平滑筋および内皮細胞が残存し機能していると考えられる。一方、PNS (1, 2, 4, 8 Hz) では、刺激頻度に依存した弛緩反応に起因する灌流圧の下降が観察された。この反応は、acetylcholine および SNP の反応と異なり、反応時間が長く持続的であった。CGRP (5, 10 pmol) の注入によっても用量に依存的で、PNS の反応と類似した持続的な弛緩反応が観察された。

神経毒 tetrodotoxin を用いて弛緩反応の神経性の反応を検討した結果、tetrodotoxin (0.5 μ M) 存在下では、PNS による弛緩反応は有意に抑制された (Fig. 16B, 17A)。しかし、CGRP および acetylcholine、SNP による弛緩反応は、tetrodotoxin 存在下でも正常標本と同様に出現し、影響はみられなかった (Fig. 17B, 17C, 17D)。

3.6 PNS および acetylcholine、SNP、CGRP による血管弛緩反応に対する capsaicin の影響

Capsaicin 処置して CGRP 含有神経機能を喪失させた腸間動脈灌流標本において、PNS (2, 4, 8 Hz) による血管弛緩反応は著明に抑制された (Fig. 18A, 18B)。一方で、この標本では、CGRP、acetylcholine および SNP 注入による弛緩反応は、正常標本と同様に出現して影響はみられなかった (Fig. 18C, 18D, 18E)。

3.7 PNS および CGRP による血管弛緩反応に対する CGRP8-37 の影響

CGRP 受容体拮抗薬 CGRP8-37 存在下では、非存在下と比較して PNS (2 Hz) および CGRP (5 pmol) 注入による血管弛緩反応は有意に抑制された (Fig. 19)。

3.8 免疫組織化学

マウス腸間膜血管における血管周囲神経の分布を免疫組織化学的に検討した結果、Fig. 20 に示したように、交感神経に属する TH 免疫陽性線維がマウス腸間膜動脈に密に、また、血管周囲を網目状に取り巻くように外膜層に分布していることが観察された (Fig. 20B)。さらに、静脈にも同様に TH 免疫陽性線維の分布が確認されたが、その分布密度は疎であった (Fig. 20C)。

マウス腸間膜動脈において、CGRP 免疫陽性線維が分布していることが観察された。CGRP 免疫陽性線維は、TH 免疫陽性線維の分布密度と比較して疎であったが、マウス腸間膜動脈の血管周囲に取り巻くように外膜層に分布していた (Fig. 20E)。また、Fig. 20F に示したように、静脈にも疎であるが CGRP 免疫陽性線維が観察された。

一次抗体がない状態では、TH および CGRP 免疫陽性線維は観察されなかった (Fig. 20A, 20D)。交感神経毒 6-OHDA 処置した動脈標本では TH 免疫陽

性線維は消失して観察されなかったが (Fig. 20G)、CGRP 免疫陽性線維は正常標本と同様な分布がみられた (Fig. 20I)。一方、CGRP 枯渴物質 capsaicin 処置した標本では、CGRP 免疫陽性線維は観察されなかったが (Fig. 20J)、TH 免疫陽性線維は影響を受けず、capsaicin 処置しなかった標本と同様な分布が観察された (Fig. 20H)。

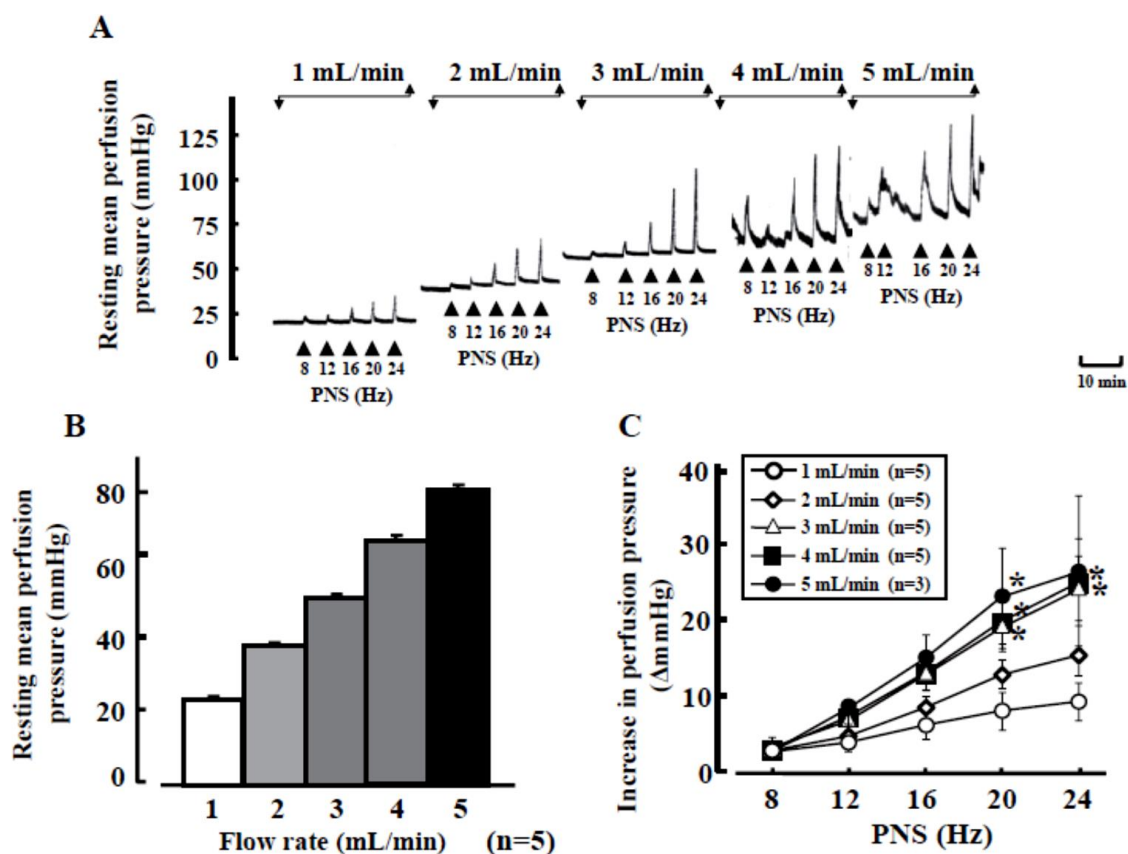


Fig. 12. Determination of optimal flow rate based on PNS-induced responses in male mouse perfused mesenteric vascular beds. A typical recording (A) showing PNS-induced vasoconstriction of a flow rate of 1 - 5 mL/min. A bar graph (B) and a line graph (C) show flow rate-induced changes in resting perfusion pressure and PNS-induced vasoconstrictor response. Each bar indicates mean \pm S.E.M. * P < 0.05 compared with 1 mL/min group using a two-way ANOVA and Bonferroni's multiple test.

(J Pharmacol Sci vol.119、p263 に投稿・掲載済)

Table 3. Effect of papaverine (PPV, 100 μ M) on flow rate (1 to 5 ml/min)-induced changes in resting perfusion pressure of male mouse mesenteric vascular beds.

(J Pharmacol Sci vol.119、p264 に投稿・掲載済)

	n	Flow rate of perfusion (mL/min)				
		1	2	3	4	5
Control	4	18.8 \pm 1.9	31.5 \pm 2.4	42.0 \pm 2.3	52.0 \pm 2.8	60.8 \pm 3.3
Papaverine (100 μ M)	4	18.0 \pm 1.9	30.8 \pm 2.8	40.8 \pm 2.6	50.5 \pm 2.7	59.5 \pm 3.0

PPV was continuously perfused with during the experiment. Data are reported as the mean \pm S.E.M.

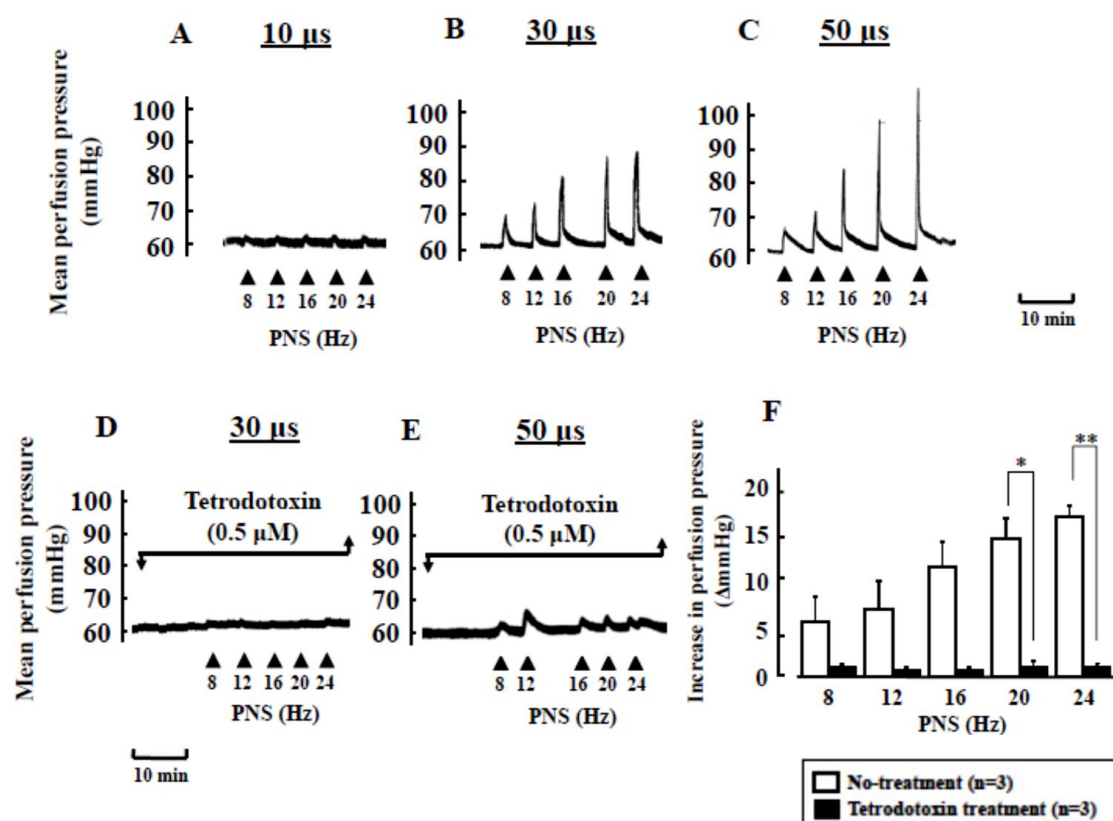


Fig. 13. Typical recordings showing influence of pulse duration and tetrodotoxin on frequency-dependent vascular responses induced by periarterial nerve stimulation (PNS: 8, 12, 16, 20 and 24 Hz) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with resting tension. Panels A, B, and C indicate the responses to 10-, 30-, and 50- μ s pulse duration, respectively. Panels D and E show responses to 30- and 50- μ s pulse duration in the presence of tetrodotoxin (0.5 μ M), respectively. A bar graph (F) shows the effect of tetrodotoxin on the response to 30- μ s pulse duration. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with no-treatment.

(J Pharmacol Sci vol.119、p264 に投稿・掲載済)

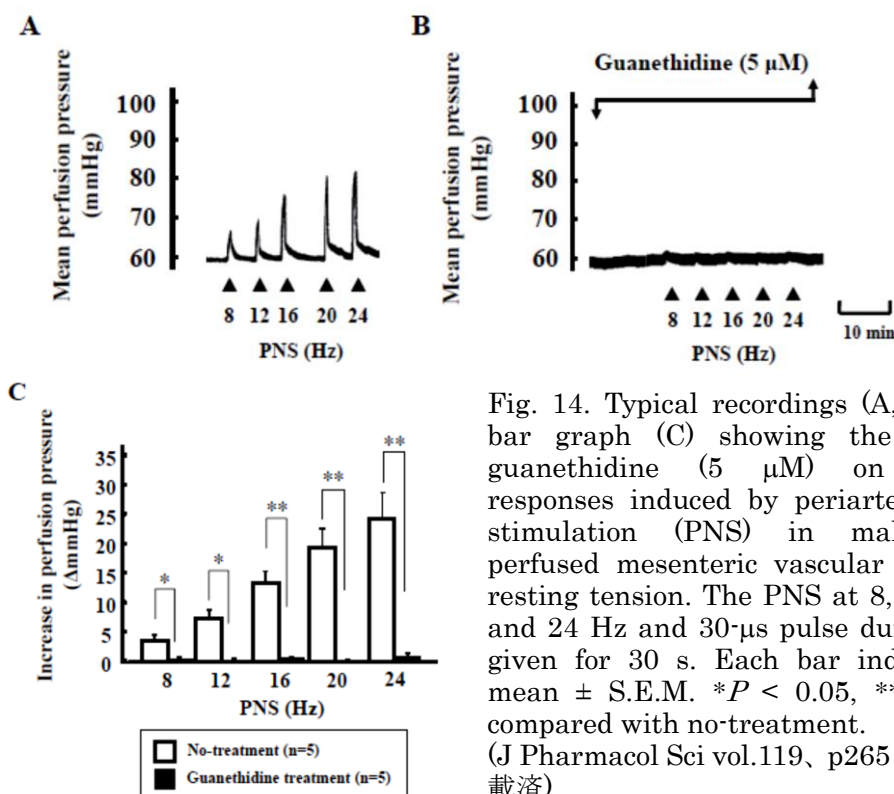


Fig. 14. Typical recordings (A, B) and a bar graph (C) showing the effect of guanethidine (5 μM) on vascular responses induced by periarterial nerve stimulation (PNS) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with resting tension. The PNS at 8, 12, 16, 20 and 24 Hz and 30-μs pulse duration was given for 30 s. Each bar indicates the mean ± S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with no-treatment. (J Pharmacol Sci vol.119, p265 に投稿・掲載済)

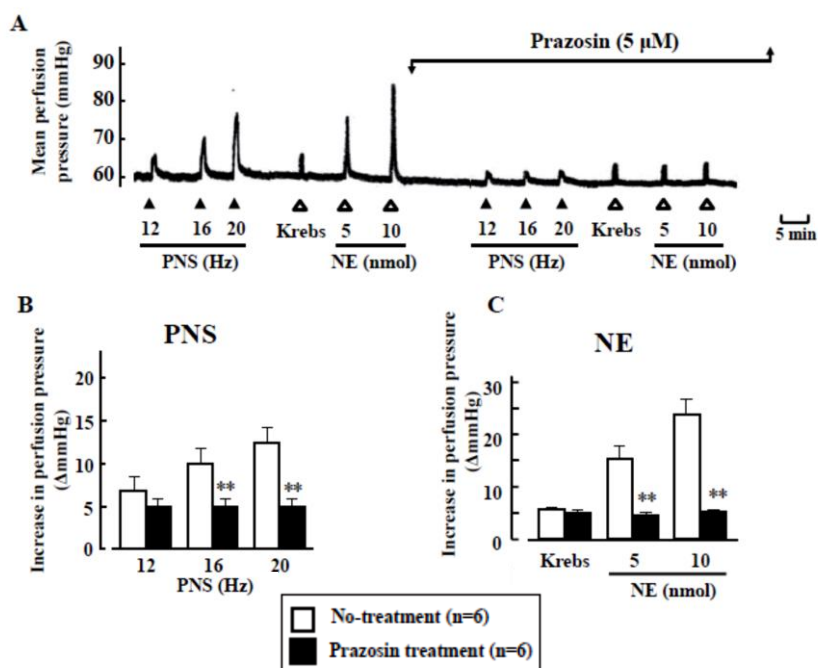


Fig. 15. A typical recording (A) and bar graphs (B and C) showing the effect of prazosin (5 μM) on vascular responses induced by periarterial nerve stimulation (PNS; 12, 16 and 20 Hz) (B) and injections of norepinephrine (NE, 5 and 10 nmol) (C) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with resting tension. Each bar indicates the mean ± S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with no-treatment. (J Pharmacol Sci vol.119, p265 に投稿・掲載済)

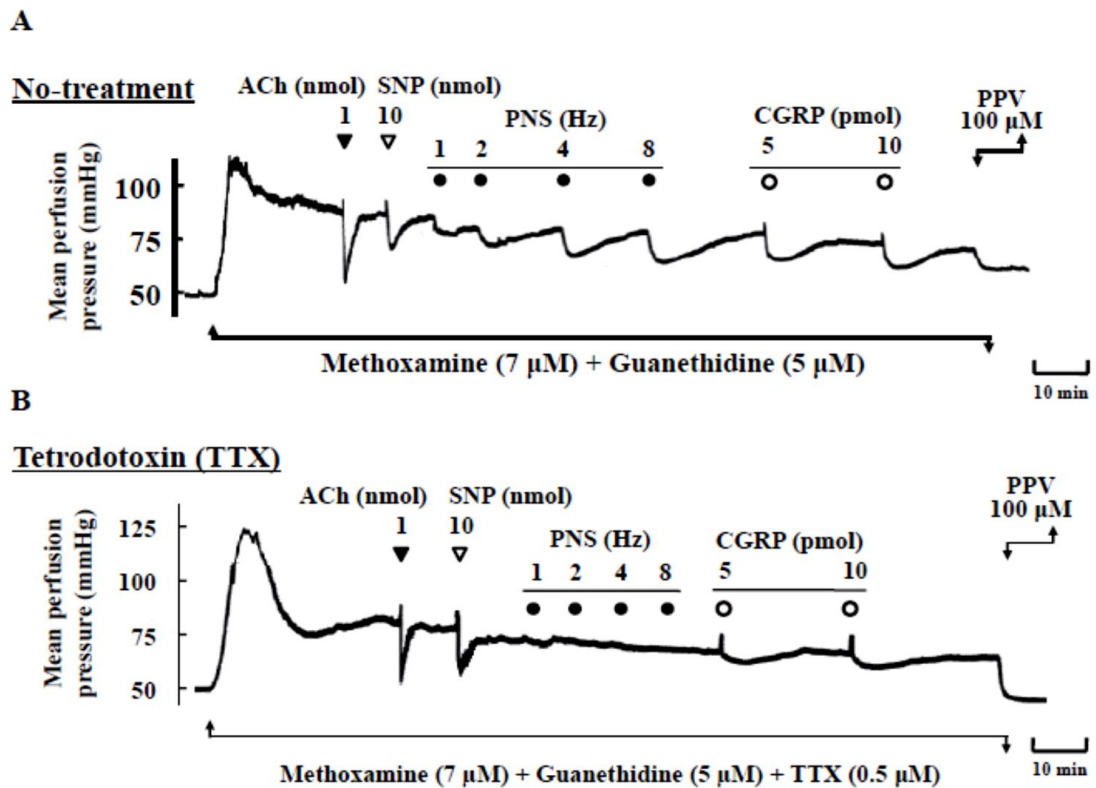


Fig. 16. Typical recordings showing vascular responses induced by periarterial nerve stimulation (PNS; 1, 2, 4 and 8 Hz) and injections of acetylcholine (ACh, 1 nmol), sodium nitroprusside (SNP, 10 nmol) and calcitonin gene-related peptide (CGRP, 5 and 10 pmol) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with active tone. Panels A and B show the response in the absence and presence of tetrodotoxin (0.5 μ M), respectively. Active tone was produced by continuous perfusion of methoxamine. Papaverine (PPV, 100 μ M) was perfused at the end of the experiment to produce complete relaxation.

(J Pharmacol Sci vol.119、p266 に投稿・掲載済)

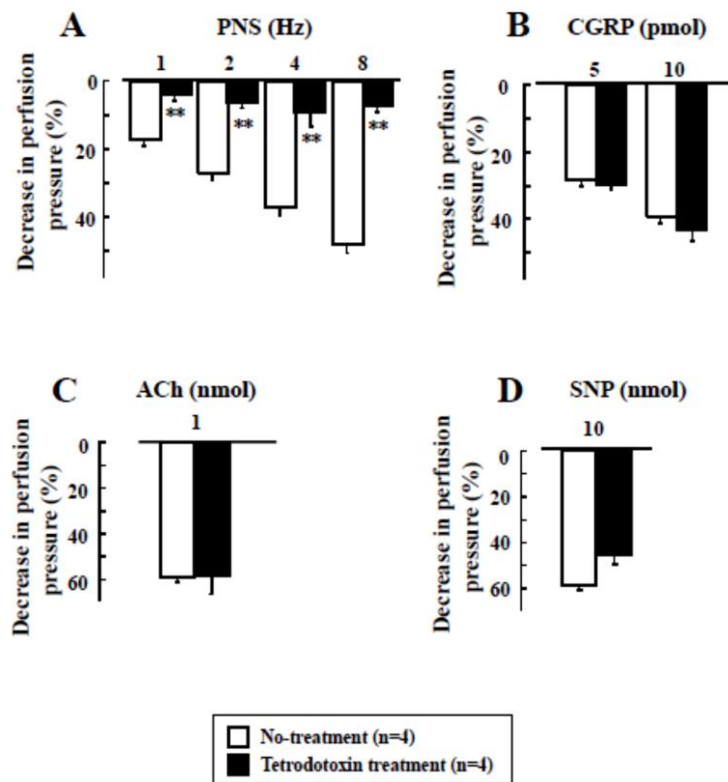


Fig. 17. Bar graphs showing effect of tetrodotoxin ($0.5 \mu\text{M}$) on vascular responses to periarterial nerve stimulation (PNS; 1, 2, 4 and 8 Hz) (A), CGRP (5 and 10 pmol) (B), acetylcholine (ACh, 1 nmol) (C) and sodium nitroprusside (SNP, 10 nmol) (D) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. $**P < 0.01$, compared with no-treatment.
 (J Pharmacol Sci vol.119、p266 に投稿・掲載済)

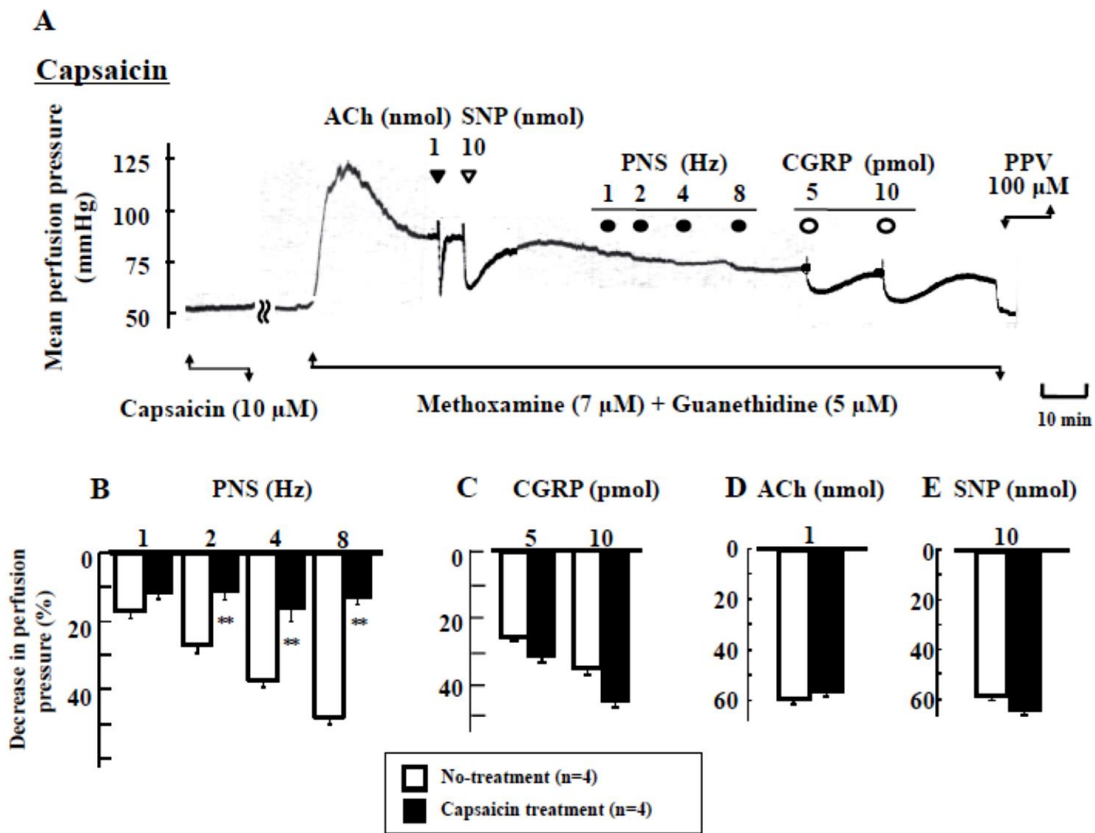


Fig. 18. A typical recording (A) and bar graphs showing effect of capsaicin treatment (10 μ M) on vascular responses to periarterial nerve stimulation (PNS; 1, 2, 4 and 8 Hz) (B) and injections of calcitonin gene-related peptide (CGRP, 5 and 10 pmol) (C), acetylcholine (ACh, 1 nmol) (D), sodium nitroprusside (SNP, 10 nmol) (E) and in male mouse perfused mesenteric vascular beds with active tone. Active tone was produced by continuous perfusion of methoxamine. Papaverine (PPV, 100 μ M) was perfused at the end of the experiment to produce complete relaxation. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. ** $P < 0.01$, compared with no-treatment. (J Pharmacol Sci vol.119、p267 に投稿・掲載済)

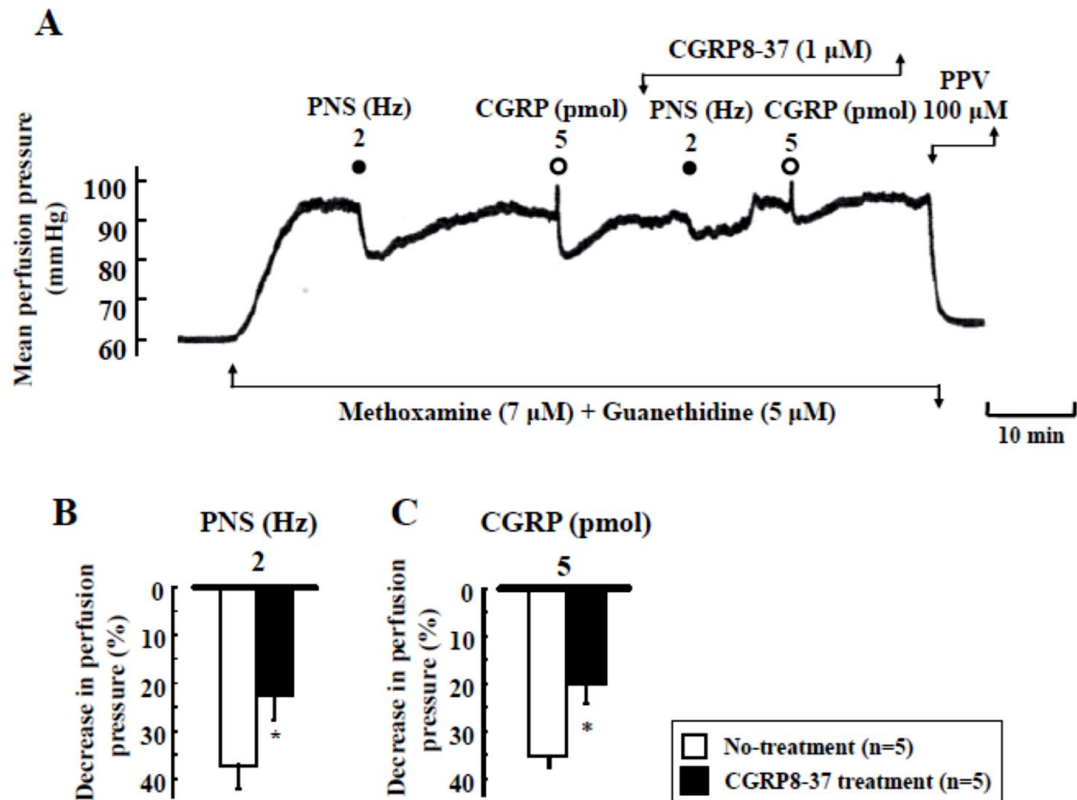


Fig. 19. A typical recording (A) and bar graphs showing the effect of CGRP8-37 (1 μM) on vascular responses induced by periarterial nerve stimulation (PNS, 2 Hz) (B) and injections of calcitonin gene-related peptide (CGRP, 5 pmol) (C) in male mouse perfused mesenteric vascular beds with active tone. Active tone was produced by continuous perfusion of methoxamine. Papaverine (PPV, 100 μM) was perfused at the end of the experiment to produce complete relaxation. Each bar indicates the mean ± S.E.M. * $P < 0.05$, compared with no-treatment.

(J Pharmacol Sci vol.119、p267 に投稿・掲載済)

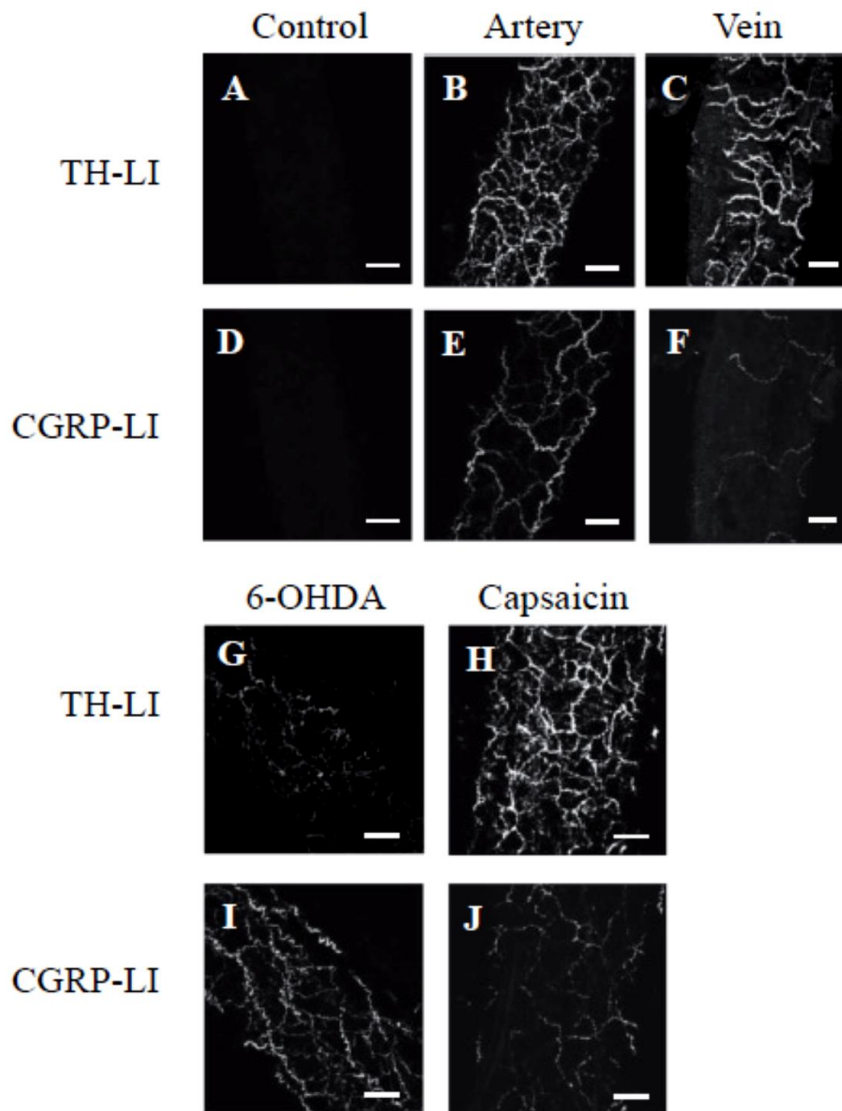


Fig. 20. Immunohistochemical images showing adrenergic tyrosine hydroxylase (TH)-like immunoreactive (LI)- and CGRPergic CGRP-LI-containing nerve fibers in male mouse mesenteric arteries (B, E) and veins (C, F) and in arteries treated with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (G, I) or capsaicin (H, J). Images A and D show experiments without the primary antibody and drug treatment in which arteries were treated with the secondary antibodies alone as a control for non-specific staining. Horizontal bars indicate 50 μ m.

(J Pharmacol Sci vol.119、p268 に投稿・掲載済)

4. 考察

本章では、マウスから摘出した腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、経壁電気刺激 (PNS) によりラット (Kawasaki *et al.*, 1988, 1990b) 腸間膜動脈標本と同様に交感経性の血管収縮反応およびカプサイシン感受性 CGRP 含有神経性の血管弛緩反応が生じることを初めて明らかにしたものである。一般的に、腸間膜動脈の灌流標本にはラットが用いられ、マウスでの報告は少ない。また、マウス腸間膜動脈を用いた灌流実験では、灌流速度が 0.4~3.5 mL/min (Grant *et al.*, 2004; Timponi *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007) と大きく差がある。そこで本章では、まず初めに灌流速度を 1~5 mL/min に変化させ、流速依存的な灌流圧上昇を観察した (Fig. 12)。この反応は、血管弛緩薬である papaverine の存在下においても影響がみられなかったことから、灌流速度の上昇により血管緊張が生じたのではなく、血管抵抗が増大したためと考えられる。加えて、静止緊張状態では、血管が完全に拡張していると考えられる。しかし、灌流速度 4 mL/min 以上では、何も刺激をしていない状態でも灌流圧の動揺が観察された。さらに、灌流速度の上昇に伴い、PNS による血管反応は増大したが、3 mL/min 以上では血管反応性に差はみられなかった (Fig. 12)。従って、マウス腸間膜動脈を用いた灌流実験では、3 mL/min が至適灌流速度であると判断した。

静止緊張状態において、PNS による刺激頻度に依存した血管収縮反応は、電位依存性 Na⁺ channel 阻害薬で、神経からの伝達物質放出を遮断する tetrodotoxin (Narahashi, 2008) の存在下で消失した。従って、PNS による血管反応は神経性であると考えられる。さらに、交感神経遮断薬である guanethidine (Kawasaki *et al.*, 2009) 存在下、PNS による収縮反応が消失したことから、交感神経を介した反応であると推察される。加えて、免疫組織化学的検討では、マウス腸間膜動脈および静脈の血管周囲に交感神経に属する TH 免疫陽性線維が密に分布していることが観察された (Fig. 20)。TH 免疫陽性線維は、capsaicin では影響はみられなかったが、交感神経を化学的に破壊する 6-OHDA 処置により消失した。従って、ラット腸間膜動脈と同様に交感神経が神経支配していると考えられる。これらのマウス腸間膜動脈血管床から得られた結果は、ラット標本を用いた報告 (Kawasaki *et al.*, 1988, 2009; Shiraki *et al.*, 2000; Hobara *et al.*, 2004) とよく一致している。

ラット腸間膜動脈を用いた研究では、PNS のパルス幅は 100~1000 μsec (Kawasaki *et al.*, 1988, 2009; Haddock and Hill, 2011) が用いられているが、マウスではパルス幅 30 μsec の PNS で刺激頻度に依存した血管収縮反応が観察できた。パルス幅 30 μsec の PNS による収縮反応は、tetrodotoxin および guanethidine 存在下で消失したが、パルス幅 50 μsec では抑制されるものの残存した (Fig. 13E)。従って、パルス幅 50 μsec では血管平滑筋自体を直接刺激している可能性が高く、マウス腸間膜動脈血管床において血管周囲交感神経を介した反応を観察するためには、パルス幅 30 μsec が至適条件であると考えられる。

α_1 アドレナリン受容体拮抗薬である prazosin 存在下、PNS および noradrenaline 注入による血管収縮反応は著明に抑制された。Noradrenaline は、交感神経から放出される主たる伝達物質であり、 α_1 および α_2 アドレナリン受容体を活性化させる。また、マウス腸間膜動脈において noradrenaline は α_1 アドレナリン受容体を介して血管収縮反応を惹起させることが報告されていることから (Pérez *et al.*, 2007)、本章においても、PNS により主に交感神経から noradrenaline が放出し、 α_1 アドレナリン受容体を介して収縮反応が生じたと考えられる。しかし、PNS による収縮反応は prazosin 存在下に完全には消失せず小さいけれど残存した。交感神経の終末には伝達物質として noradrenaline の他に、NPY、ATP などが cotransmitter として共存している (Lundberg, 1996; Haddock and Hill, 2011)。従って、prazosin 存在下に残存した収縮反応は、 α_2 アドレナリン受容体を介した収縮反応、さらには、PNS により noradrenaline と同時にこれらの神経伝達物質が遊離し生じた可能性が考えられる。

ラット腸間膜動脈血管床における CGRP 含有神経の分布と機能については、免疫組織化学的および神経薬理的解析により明らかにされている (Kawasaki *et al.*, 1988)。ラット腸間膜動脈において、灌流圧上昇条件下に PNS により血管弛緩反応が生じ、その反応は tetrodotoxin および capsaicin、CGRP 受容体拮抗薬である CGRP8-37 により消失する。近年、マウス腸間膜動脈の CGRP 含有神経の分布と血管拡張性機能について、薬理的および免疫組織化学的検討により報告されている (Wang *et al.*, 2006; De *et al.* 2008)。本章においても、灌流圧上昇条件下、PNS により刺激頻度に依存した血管弛緩反応が観察され、その反応は tetrodotoxin 存在下および capsaicin 処置標本において消失した。加え

て、CGRP 注入による持続した弛緩反応と類似した血管反応であった。さらに、PNS および CGRP 注入による弛緩反応は CGRP8-37 存在下で抑制されたことから、PNS による弛緩反応は CGRP 含有神経を介していること、またマウス腸間膜動脈にも CGRP 受容体が存在していることが明らかとなった。しかし、PNS による弛緩反応は、CGRP8-37 存在下に完全には消失しなかった。一方で、ラット腸間膜動脈では、1 μ M の CGRP8-37 存在下、PNS による弛緩反応はほぼ完全に消失している (Kawasaki *et al.*, 1991)。ことから、マウスとラットでは CGRP8-37 に対する感受性が異なるのかもしれない。さらに、本章では capsaicin 処置標本においても、PNS による弛緩反応は小さいけれど残存した (Fig. 18)。従って、PNS による弛緩反応は、主に CGRP 含有神経を介しているが、一部 NO 神経や未知の非アドレナリン・非コリン作動性神経を介している可能性が考えられる。加えて、動脈血管周囲に CGRP 含有神経に属する CGRP 免疫陽性線維が密に分布していたことから、TH 免疫陽性反応を示す交感神経と共に血管緊張度調節に寄与していることが明らかとなった。

本実験では、8 Hz 以下の PNS では、交感神経性の収縮反応は小さいか、あるいは生じなかったが、反対に CGRP 含有神経性の弛緩反応は 8 Hz 以下でも生じた。本実験系において、静止緊張状態にて収縮反応を観察した場合、PNS は交感神経および CGRP 含有神経を同時に刺激する。ラット標本を用いた研究では、capsaicin 処置により CGRP 含有神経機能を喪失させたとき、交感神経を介する血管収縮反応が増大することが報告されている (Kawasaki *et al.*, 1990b)。従って、低頻度の刺激条件では CGRP 含有神経を介する弛緩反応がより大きいために、交感神経性の収縮反応が減弱していると考えられる。加えて、静止緊張状態では血管が完全に拡張しているため、静止緊張状態で収縮反応を観察するためにはより高頻度の刺激条件が必要である可能性がある。一方、CGRP 含有神経性の弛緩反応を観察する場合、guanethidine により交感神経の神経伝達が遮断されているため、弛緩反応のみを容易に観察することが可能である。

本章の結果は、マウス腸間膜動脈において血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Fig. 21)。また、腸間膜動脈灌流標本をマウスでも作製することが可能であることを明らかにし、血管周囲神経の機能を評価するにあたり最適な灌流速度および PNS の諸条件を設定して、評価系の確立に貢献したものである。

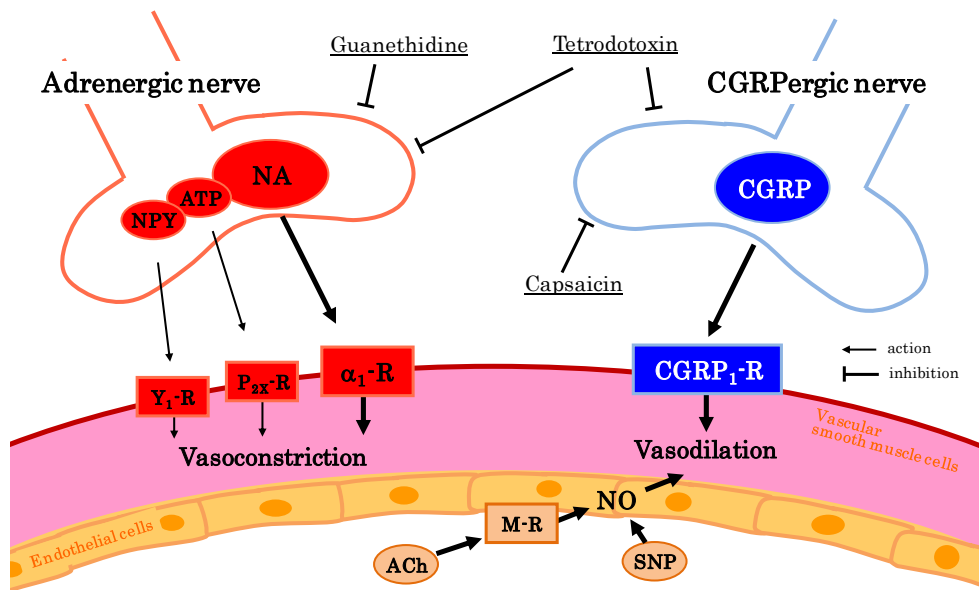


Fig. 21. Perivascular innervation and possible mechanisms underlying adrenergic nerve-mediated vasoconstriction and CGRPergic nerve-mediated vasodilation in male mouse perfused mesenteric vascular beds.

Abbreviations: NA, noradrenaline; ATP, adenosine 5'-triphosphate; NPY, neuropeptide Y; CGRP, calcitonin gene-related peptide; ACh, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside; NO, nitric oxide; α₁-R, α₁-adrenoceptor; M-R, muscarine receptor; -R, -receptor.

5. 小括

第二章では、マウス腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、灌流速度および PNS の諸条件を検討した。また、ラット腸間膜動脈と同様に血管周囲に交感神経および CGRP 含有神経が分布し、これら両神経を介した血管反応が観察されるか検討した。

その結果、以下の知見が得られた。

1. マウス腸間膜動脈灌流標本において、静止緊張状態で灌流速度を上昇させると平均灌流圧の上昇が観察された。また、PNS による血管反応は灌流速度の上昇に伴い増大したが、3 mL/min 以上の灌流速度では、血管反応は同程度で差は認められなかった。さらに、灌流速度 4 および 5 mL/min の時、灌流圧が上下に変動し不安定になることが観察された。
2. 血管弛緩薬 papaverine (100 μ M) 存在下、いずれの灌流速度 (1~5 mL/min) においても静止緊張状態の灌流圧に変化はみられなかった。
3. PNS (電圧; 50 V, 刺激頻度; 8~24 Hz, パルス幅; 10~50 μ sec) により一過性の血管収縮反応が観察され、パルス幅の増大に伴い、この収縮反応は増大した。パルス幅 30, 50 μ sec の PNS では、刺激頻度に依存した血管収縮反応が観察された。
4. パルス幅 30 μ sec の PNS により観察された血管収縮反応は、tetrodotoxin (0.5 μ M) および guanethidine (5 μ M) 存在下で消失したが、パルス幅 50 μ sec の PNS により観察された収縮反応は、残存し完全に消失しなかった。
5. Prazosin (5 μ M) 存在下では、PNS による血管収縮反応は有意に減弱したが残存した。一方で、noradrenaline による血管収縮反応は prazosin 存在下で消失した。

6. Acetylcholine、SNP により一過性の血管弛緩反応が観察された。また、PNS および CGRP により持続的な弛緩反応が頻度および用量依存的に観察された。
7. Tetrodotoxin (0.5 μ M) 存在下では、PNS による血管弛緩反応は有意に抑制されたが、acetylcholine、SNP および CGRP による弛緩反応に影響はみられなかった。
8. Capsaicin 処置した標本では、PNS による血管弛緩反応は有意に抑制されたが、acetylcholine、SNP および CGRP による弛緩反応に影響はみられなかった。
9. CGRP8-37 (1 μ M) 存在下では、PNS および CGRP による血管弛緩反応は、非存在下と比較して有意に抑制された。
10. 腸間膜動脈および静脈において、TH 免疫陽性線維および CGRP 免疫陽性線維が血管周囲を網目状に取り巻いて外膜層に分布していることが観察された。
11. TH 免疫陽性線維は 6-OHDA 処置により消失したが、CGRP 免疫陽性線維は影響を受けなかった。一方、capsaicin 処置により CGRP 免疫陽性線維は消失したが、TH 免疫陽性線維は影響を受けなかった。

以上の結果より、マウス腸間膜動脈において血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、PNS によりこれら両神経を介する血管反応を観察できることが明らかとなり、ラットと同様に血管周囲神経が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆される。

第三章

マウス腸間膜動脈灌流標本における内皮依存性血管弛緩反応

1. 目的

血管内皮細胞は、血管内腔側にある 1 層の細胞群であり、従来は血液凝固を防止する機能を有する細胞と考えられていた。しかし、1980 年の Furchgott らの発見により、内皮細胞が血管を弛緩させる血管内皮細胞由来弛緩因子 (endothelial-derived relaxing factor; EDRF) を産生・放出することで血管緊張度調節に関与することが明らかにされた。さらに、その後の研究で、内皮細胞は EDRF ばかりでなく、血管を収縮させるエンドセリンやプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 、トロンボキサン A_2 などの血管内皮細胞由来収縮因子 (endothelial-derived constricting factor; EDCF) を産生・放出することも明らかとなっている (De Mey and Vanhoutte; 1982)。これらの因子は、神経因子と同様に体液性因子として血管緊張度調節を行っていると考えられている。内皮細胞がその発現に必須である弛緩反応、すなわち内皮依存性弛緩反応は、血流による shear stress 等の物理的的刺激や様々な内因性、外因性作動物質等の化学的な刺激により EDRF が産生・放出されて生じるとされている。現在、主に 3 つの弛緩因子、nitric oxide (NO) (Kelm *et al.*, 1988; Palmer *et al.*, 1989)、prostaglandin I_2 (PGI_2) (Waldron and Cole, 1999)、endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Brandes *et al.*, 2000; Fitzgerald *et al.*, 2007) が EDRF として同定されている。しかしながら、EDRF はすべての血管で内皮依存性の弛緩反応に関係しているとは限らずに、動物の種差でも異なり、また、同じ動物種でも血管部位あるいは血管径の違いにより、EDRF の関与が異なることが知られている。一般に、大動脈や導管動脈において主な EDRF は NO であるが、小血管や抵抗血管、特に腸間膜動脈においては EDHF が重要な役割を果たしている。一方、 PGI_2 は、大動脈および抵抗血管のいずれの血管において EDRF として内皮依存性弛緩に関与していることが報告されている (Shimokawa *et al.*, 1996)。内皮細胞から遊離した EDHF は、血管平滑筋の過分極を引き起こし、最終的に血管を弛緩させる。また、この EDHF による反応は、NO 合成酵素 (NOS) 阻害薬および cyclooxygenase (COX) 阻害薬存在下でも観察される (Chen *et al.*, 1991)。EDHF 本体については、epoxyeicosatrienoic acid (Chambell *et al.*,

1996)、 K^+ イオン (Edwards *et al.*, 1998)、hydrogen peroxide (H_2O_2) (Pomposiello *et al.*, 1999) や gap-junction (Chaytor *et al.*, 2002; Griffith, 2004) を介するものなど幾つか報告されているものの、十分に明らかにされていない。ラット腸間膜動脈では、histamine、bradykinin、acetylcholine、A23187 (Ca^{2+} ionophore) を用いた内皮依存性弛緩反応について異なる EDHF が関与することが報告されている (Shiraki *et al.*, 2001; Nawa *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2008, 2009)。これまでに、マウスの胸部や腹部大動脈のリング状標本を用いた研究 (Matoba *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2003) が行われているが、マウス腸間膜動脈における EDRF の役割についてはほとんど明らかにされていない。加えて、遺伝子操作した病態モデルマウスを用いて血管内皮機能を解析するためには、まだその機能についての報告が少なく十分ではない。従って、本章では EDRF、特に EDHF について、内皮依存性弛緩反応を惹起させる acetylcholine および A23187 を用いて検討した。

2. 実験材料および実験方法

2.1 実験動物

第二章 2.1 に準ずる。

本研究は岡山理科大学動物実験ガイドラインに従って実施した。

2.2 マウス腸間膜動脈灌流標本の作製

第二章 2.2 に準ずる。

2.3 灌流圧測定

第二章 2.3 に準ずる。ただし、灌流速度は一定流量 (3 mL/min) に固定した。

2.4 Acetylcholine および sodium nitroprusside (SNP)、A23187 の注入

Acetylcholine および SNP、A23187 は、標本の動脈カニューレ付近の灌流液中にインジェクションポンプにて直接注入した (注入速度: 60 μ L/12 sec)。薬物の注入は、灌流圧が刺激前と同程度まで戻った後に行った。

2.5 化学的血管内皮機能喪失標本の作製

血管内皮機能喪失標本の作製は、Takenaga ら (1995) の方法を参考にした。静止緊張状態の標本に、生理食塩水に溶解した sodium deoxycholate (1.80 mg/mL) を 30 秒間灌流することで血管内皮機能を喪失させた。その後、sodium deoxycholate を含まない Krebs 液に置換して 30 分間の灌流洗浄後に、各種作動薬による血管反応を観察した。

2.6 実験プロトコール

血管弛緩反応を観察するために、 α_1 アドレナリン受容体作動薬である methoxamine (3~20 μ M) および交感神経の影響を除くために guanethidine (5 μ M) を加えた Krebs 液で灌流圧を上昇させた。灌流圧が安定した後、acetylcholine (0.01, 0.1, 1 nmol) および SNP (1, 10 nmol)、A23187 (0.1, 1 nmol) を注入した。

各種薬物誘発弛緩反応に対する血管内皮細胞の影響については、sodium deoxycholate により内皮機能を喪失させた標本を用いて検討を行った。Sodium deoxycholate 灌流処置することで内皮機能喪失標本を作製した後、methoxamine (10 μ M) および guanethidine (5 μ M) を加えた Krebs 液に置換して灌流圧を上昇させた。灌流圧が安定した後、各種作動薬を注入し、正常な標本と血管反応を比較した。

また、各種作動薬誘発弛緩反応における EDRF の関与については、内皮機能を喪失させていない標本を用いて検討した。NOS 阻害薬 N_{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; 100 or 500 μ M)、COX 阻害薬 indometacin (1 μ M)、 K^+ channel 阻害薬 tetraethylammonium (TEA; 5 mM)、ATP 感受性 K^+ channel 阻害薬 glibenclamide (10 μ M) および gap-junction 阻害薬 18 α -glycyrrhetic acid (18 α -GA; 100 nM) の存在下に各種作動薬を注入し、非存在下の血管反応と比較した。

それぞれの実験の終わりに、血管弛緩薬 papaverine (100 μ M) を灌流して最大弛緩を求めた。血管弛緩反応は、papaverine による最大弛緩反応を 100% として弛緩率 (%) で評価した。

2.7 統計学的解析

得られた実験値はすべて、平均値±標準誤差 (mean±S.E.M.) で示した。統計学的解析は、2 群間比較には対応のない Student's *t* 検定を用い、また、多群間の比較では、一元配置の分散分析 (analysis of variance, ANOVA) 後、Tukey の多重比較検定法を用いて統計学的処理を行った。いずれも危険率は 5%以下を有意差ありと判定した。

2.8 使用薬物

第三章の実験には以下の薬物を使用した。

acetylcholine chloride (第一三共)、A23187 (Sigma-Aldrich Japan)、18 α -glycyrrhetic acid (Sigma-Aldrich Japan)、glibenclamide (Sigma-Aldrich Japan)、indomethacin (Sigma-Aldrich Japan)、L-NAME (Sigma-Aldrich Japan)、methoxamine hydrochloride (Sigma-Aldrich Japan)、sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich Japan)、sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich Japan)、tetraethylammonium (Sigma-Aldrich Japan)、guanethidine sulphate (東京化成工業)、papaverine hydrochloride (大日本住友製薬)。18 α -glycyrrhetic acid および A23187、glibenclamide は 100% dimethyl sulfoxide にて、indomethacin は 100 % ethanol 溶液にて溶解させ、methoxamine および guanethidine を含む Krebs 液にて最終希釈濃度に調整した。Papaverine は Krebs 液にて希釈調整した。その他の薬物は、すべて精製水にて溶解させ、Krebs 液にて最終希釈濃度に調整した。Acetylcholine、sodium nitroprusside および A23187 は、注入時に灌流している Krebs 液と同じ組成の Krebs 液で最終濃度に用時調整した。

3. 結果

3.1 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応と内皮機能喪失標本の影響

血管弛緩反応を観察するために、methoxamine (3~20 μM) および交感神経の影響を除くために guanethidine (5 μM) を加えた Krebs 液を灌流し、あらかじめ血管を収縮させて灌流圧を上昇させた。無処置の灌流標本において、acetylcholine および SNP、A23187 により用量に依存した灌流圧の減少、すなわち血管弛緩反応が観察された (Fig. 22A)。Acetylcholine による弛緩反応は、一過性の短い弛緩反応であったが、反対に SNP および A23187 による弛緩反応は、最初に早い弛緩反応が生じ、その後、持続的な弛緩反応が観察された。内皮機能を喪失させた標本においては、acetylcholine による弛緩反応は生じなかった。また、低用量の A23187 では弛緩反応は観察されなかったが、高用量の A23187 では小さいけれど弛緩反応が観察された (Fig. 22B, 22C)。しかし、SNP による弛緩反応は、内皮機能の喪失に関わらず同程度の弛緩反応が生じた。従って、sodium deoxycholate 処置後も血管平滑筋の機能は保たれていると考えられる (Fig. 22B, 22C)。

3.2 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する L-NAME の影響

無処置の内皮機能を保持した標本において、NO 合成酵素阻害薬 L-NAME (100 μM) 存在下、SNP による血管弛緩反応は増大したが (Fig. 23B)、acetylcholine および A23187 による弛緩反応には有意な差は認められなかった (Fig. 23A, 23C)。しかしながら、高濃度 L-NAME (500 μM) 存在下では、acetylcholine および A23187 による弛緩反応は有意に抑制された (Fig. 23A, 23C)。

3.3 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する indomethacin の影響

Fig. 24 に示したように、COX 阻害薬 indomethacin (1 μM) 存在下において、A23187 による弛緩反応は有意に抑制されたが (Fig. 24C)、acetylcholine およ

び SNP による弛緩反応は、無処置の標本と同様に出現し、影響はみられなかった (Fig. 24A, 24B)。

3.4 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する tetraethylammonium (TEA) および glibenclamide の影響

無処置の内皮機能を保持した標本において、非選択的 K⁺ channel 阻害薬 tetraethylammonium (5 mM) 存在下、acetylcholine および A23187 による弛緩反応は有意に抑制された (Fig. 25A, 25C)。しかし、Fig. 25B に示したように、SNP による弛緩反応は tetraethylammonium によって影響を受けなかった。

一方、Fig. 26 に示したように、ATP 感受性 K⁺ channel 阻害薬 glibenclamide (10 μM) は、acetylcholine および SNP、A23187 のいずれの弛緩反応にも影響を及ぼさなかった。

3.5 Acetylcholine および A23187、SNP による血管弛緩反応に対する 18α-glycyrrhetic acid (18α-GA) の影響

無処置の内皮機能を保持した標本において、gap-junction 阻害薬 18α-glycyrrhetic acid (100 nM) 存在下では、acetylcholine による弛緩反応は有意に抑制された (Fig. 27A)。しかし、18α-glycyrrhetic acid は、A23187 および SNP による弛緩反応に影響を及ぼさなかった (Fig. 27B, 27C)。

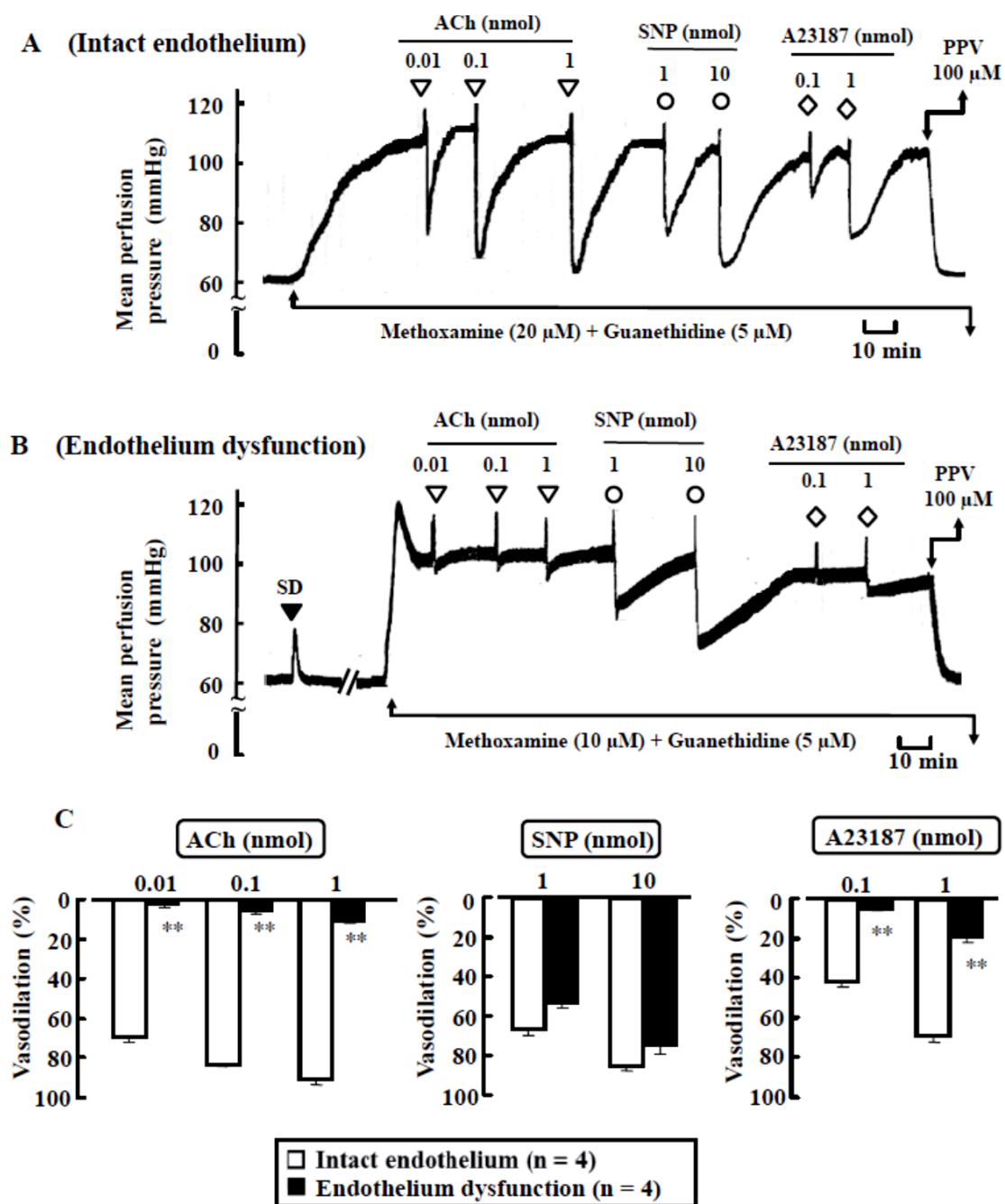


Fig. 22. Typical recordings showing vascular responses to injections of acetylcholine (ACh: 0.01, 0.1 and 1 nmol), sodium nitroprusside (SNP: 1 and 10 nmol) and Ca^{2+} ionophore (A23187: 0.1 and 1 nmol) in mouse mesenteric vascular beds with an intact endothelium (A) and inactivated endothelium (B). Active tone of the preparation was produced by perfusion of methoxamine. Papaverine (PPV: 100 μM) was perfused at the end of the experiment to induce complete relaxation. In panel B, sodium deoxycholate was perfused for 30 s to inactivate the vascular endothelium. C) Bar graphs showing the effect of endothelium dysfunction on vascular responses to injections of acetylcholine, sodium nitroprusside and calcium ionophore in mouse perfused mesenteric vascular beds. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. $**P < 0.01$, compared with an inactivated endothelium. (J Pharmacol Sci vol.118, p376 に投稿・掲載済)

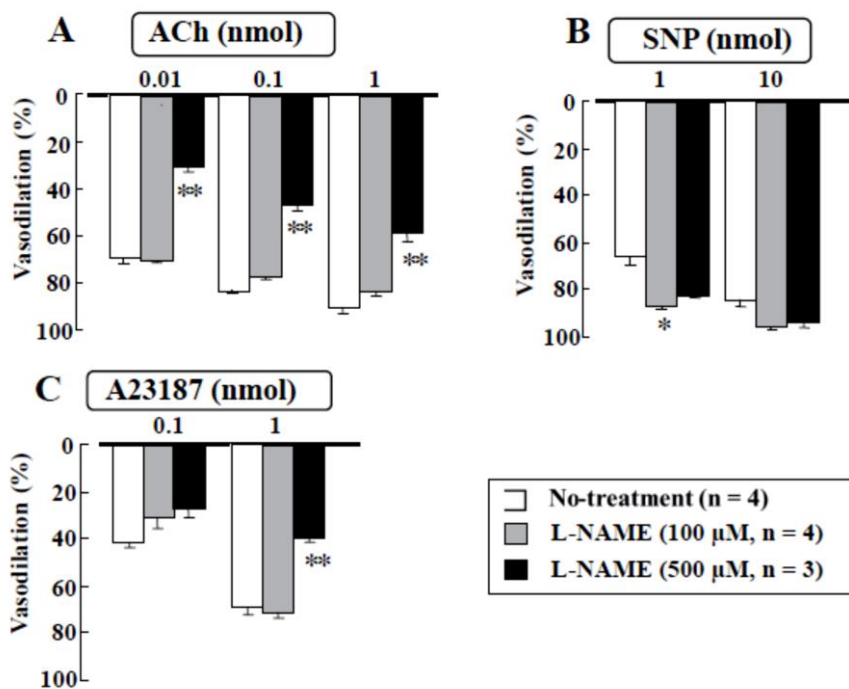


Fig. 2 Effect of the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME (100 or 500 μ M) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh: A), sodium nitroprusside (SNP: B), and Ca^{2+} ionophore (A23187: C) in mouse perfused mesenteric vascular beds with an intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with the no-treatment group. (J Pharmacol Sci vol.118, p377 に投稿・掲載済)

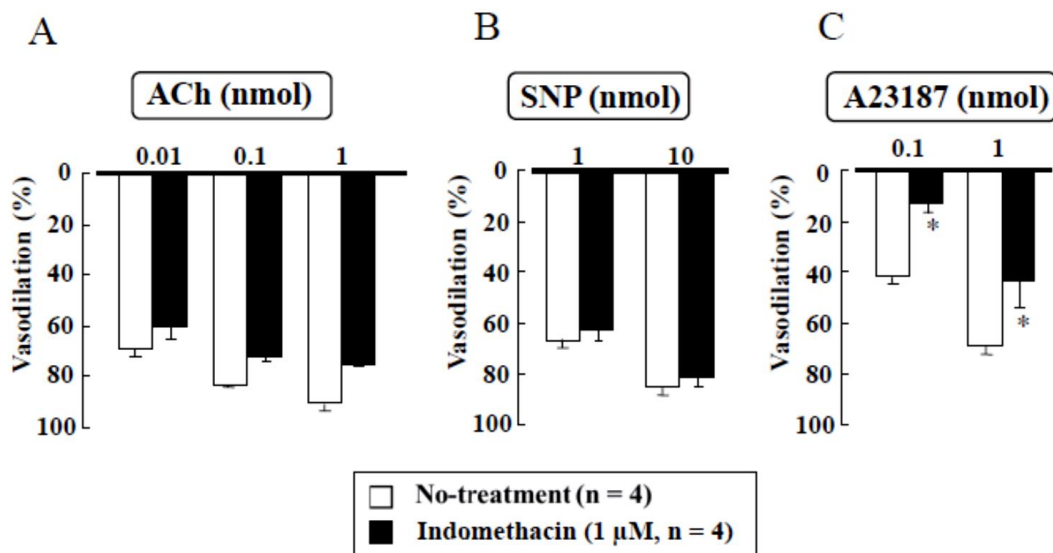


Fig. 24. Effect of the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (1 μ M) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh: A), sodium nitroprusside (SNP: B), and Ca^{2+} ionophore (A23187: C) in mouse perfused mesenteric vascular beds with intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * P < 0.05, compared with the no-treatment group. (J Pharmacol Sci vol.118, p377 に投稿・掲載済)

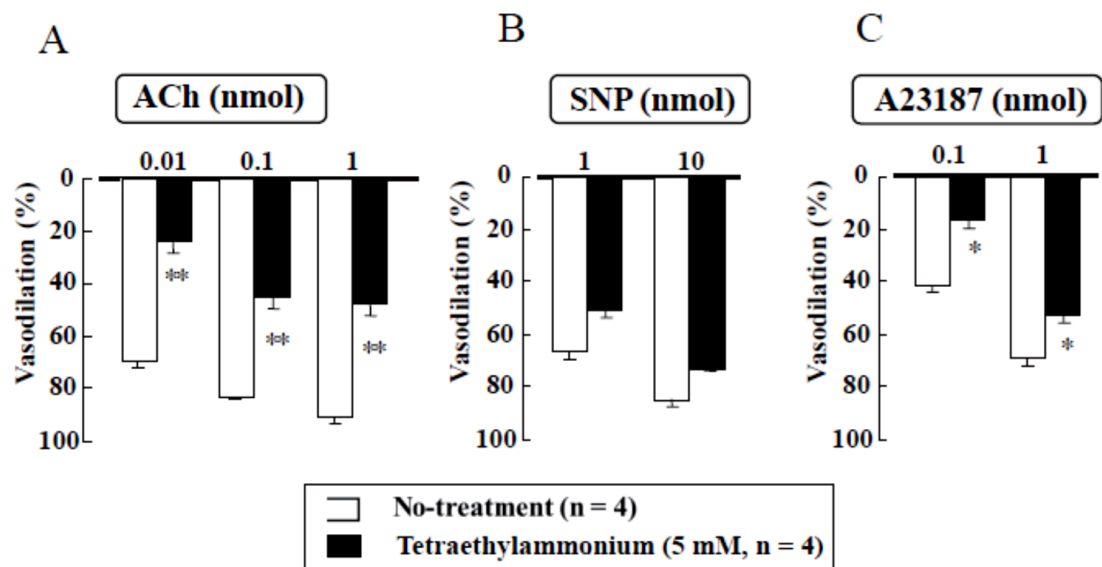


Fig. 25. Effect of the K⁺-channel inhibitor tetraethylammonium (5 mM) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh: A), sodium nitroprusside (SNP: B), and Ca²⁺ ionophore (A23187: C) in mouse perfused mesenteric vascular beds with intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean ± S.E.M. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared with the no-treatment group.
 (J Pharmacol Sci vol.118, p377 に投稿・掲載済)

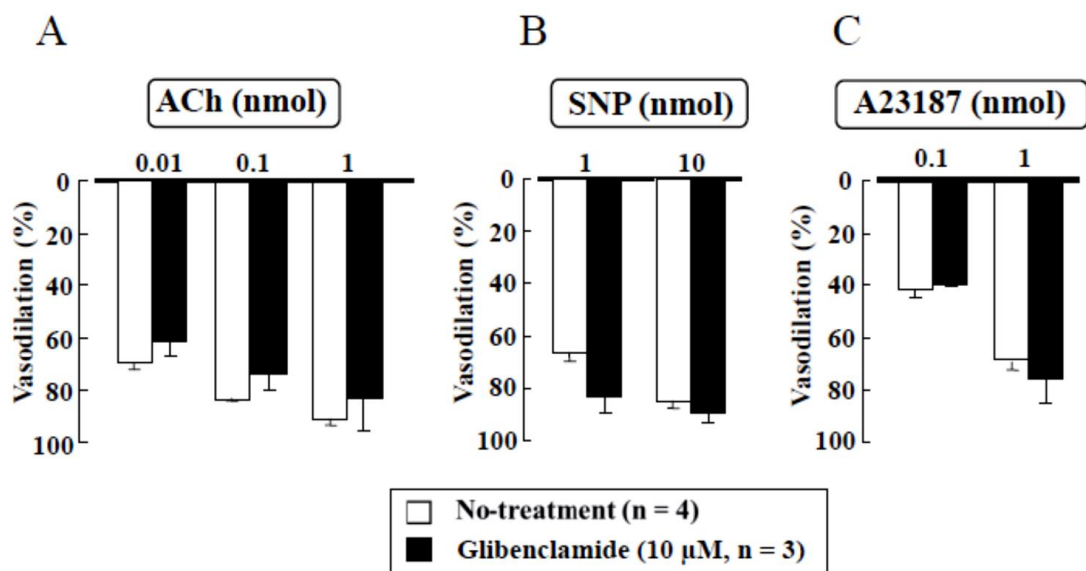


Fig. 26. Effect of the ATP-sensitive K⁺-channel inhibitor glibenclamide (10 μM) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh: A), sodium nitroprusside (SNP: B), and Ca²⁺ ionophore (A23187: C) in mouse perfused mesenteric vascular beds with intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean ± S.E.M.
 (J Pharmacol Sci vol.118, p378 に投稿・掲載済)

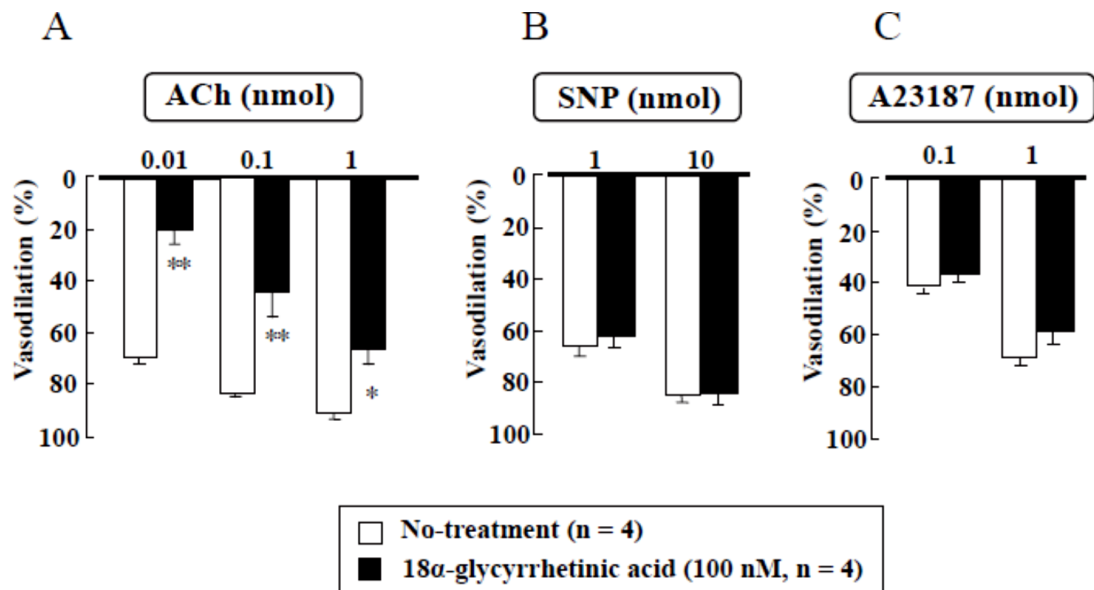


Fig. 27. Effect of the gap-junction inhibitor 18 α -glycyrrhetic acid (100 nM) on vasodilator responses to injections of acetylcholine (ACh: A), sodium nitroprusside (SNP: B), and Ca²⁺ ionophore (A23187: C) in mouse perfused mesenteric vascular beds with intact endothelium and active tone. Each bar indicates the mean \pm S.E.M. * P < 0.05, ** P < 0.01, compared with the no-treatment group.
 (J Pharmacol Sci vol.118, p378 に投稿・掲載済)

4. 考察

本章の結果より、マウス腸間膜血管床の灌流標本において外因性に acetylcholine および A23187 を注入することにより、ラット灌流標本 (Jin *et al.*, 2008, 2009) と同様に用量に依存した血管弛緩反応が生じることが明らかとなった。Acetylcholine および A23187 による両弛緩反応は、それぞれシグナル経路が異なるにも関わらず、内皮機能喪失によりその反応が消失し、内皮機能の有無に依存していた。しかし、1 nmol の acetylcholine および 1 nmol の A23187 による弛緩反応は、内皮機能喪失状態下においても小さいけれど一部弛緩反応が残存した。Takenaga ら (1995) は、内皮細胞を消失させたラット腸間膜動脈を用いた研究において、acetylcholine は CGRP 含有神経を介した内皮細胞に非依存的な弛緩反応を誘発させると報告している。従って、本章の acetylcholine および A23187 による弛緩反応は、血管周囲 CGRP 含有神経を介している可能性が考えられるが、そのメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

Jin ら (2008) は、ラット腸間膜動脈における acetylcholine および A23187 による弛緩反応が sodium deoxycholate 灌流により内皮機能を喪失させることで消失することを報告しており、Ralevic ら (1991) も同様な結果を報告している。内皮機能を喪失させる方法として、collagenase を用いた化学的方法 (Furchgott and Zawadzki, 1980)、空気を灌流させる方法 (Timponi *et al.*, 2006) が報告されているが、血管平滑筋にも影響を及ぼす。一方、sodium deoxycholate を用いる方法は、内皮細胞依存性の弛緩反応のみを消失させて内皮機能を喪失させるが、平滑筋に対する影響は小さいために (Cusma *et al.*, 1993; Takenaga *et al.*, 1995)、本章では sodium deoxycholate を用いて内皮機能を喪失させた。加えて、内皮に依存せず血管平滑筋に直接作用する sodium nitroprusside (SNP) の弛緩反応に影響を与えなかったことから、sodium deoxycholate 処置は血管平滑筋機能に影響を及ぼさず、効果的に内皮機能を喪失させたと考えられる。また、内皮機能喪失標本では、methoxamine による初期の収縮反応が増大した (Fig. 22A, 22B)。これまでに、ラット腸間膜動脈を用いた研究において、内皮細胞に由来する EDHF により、methoxamine 誘発収縮反応が抑制されることが報告されている (Jin *et al.*, 2009, 2010)。従って、マウスにおいても内皮由来の EDRF あるいは EDHF が methoxamine 誘発収縮反応を抑制していると考えられる。

NOS の基質である L-arginine と競合して酵素活性を阻害する NOS 阻害薬 L-NAME を用いて検討した結果、500 μM L-NAME 存在下に acetylcholine および A23187 による弛緩反応は有意に抑制された。ラット腸間膜動脈において、100 μM L-NAME 存在下、acetylcholine および A23187 による弛緩反応は減弱し (Jin *et al.*, 2008, 2009)、さらにそれ以下の濃度の L-NAME でも NOS 活性が抑制されること (Hatanaka *et al.*, 2006) が報告されている。従って、マウス腸間膜動脈でも 100 μM L-NAME 存在下で十分に NOS 活性が抑制されていると考えられ、NO は主要な EDRF ではないと推察される。また、高濃度の L-NAME は、非特異的な抑制作用により acetylcholine および A23187 による弛緩反応を抑制した可能性も考えられる。従って、NO の血管緊張に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要である。また、ラット腸間膜動脈では神経性 nNOS が血管緊張度調節に重要な役割を果たしており (Hatanaka *et al.*, 2006)、NOSs 欠損マウスを用いた研究では内皮細胞性 eNOS が主に EDHF を介する反応に寄与しているとの報告もある (Takaki *et al.*, 2008)。本章で用いた L-NAME は非選択的な NOS 阻害薬であるため、どのアイソフォームの NOS が EDHF に関与しているか未知であり、さらなる検討が必要である。一方で、SNP による弛緩反応は、L-NAME 存在下で増大した。ラット腸間膜動脈においても同様に、L-NAME 存在下に SNP による弛緩反応は増大する (Iwatani *et al.*, 2008)。この反応は、NO 産生が阻害された結果、可溶性 guanylate cyclase の感受性が増大したためであり、マウスにおいても同様の反応が生じていると考えられる。加えて、500 μM L-NAME 存在下では SNP による弛緩反応が増大しなかったことから、高濃度の L-NAME は非特異的な作用が働いていたと考えられる。

非選択的な COX 阻害薬である indomethacin 存在下では、acetylcholine の反応よりも A23187 による弛緩反応のみが抑制された。従って、 Ca^{2+} ionophore による弛緩反応に prostanoids が関与していると考えられる。Indomethacin は、血管拡張性 prostanoids の産生を抑制することにより内皮依存性の弛緩反応を抑制させることが報告されている (Yabek and Avner, 1980)。さらに、マウスの脳の細動脈を用いた研究において、 Ca^{2+} ionophore による弛緩反応が cyclooxygenase (COX) に依存的であることも報告されており (Rosenblum *et al.*, 1989)、本章の結果とも一致する。従って、マウス腸間膜動脈において、 Ca^{2+}

ionophore (A23187) により遊離される EDRF は NO だけでなく、prostanoids も弛緩反応に関与していることが強く示唆される (Fig.28)。

ラット腸間膜動脈において、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応は、ATP 感受性 K⁺ channel 阻害薬で抑制されないが、その他の K⁺ channel 阻害薬である tetraethylammonium および高濃度の K⁺ イオン、また apamin と charybdotoxin の併用により抑制される (Jin *et al.*, 2008, 2009)。加えて、acetylcholine による弛緩反応は、gap-junction 阻害薬である 18 α -glycyrrhetic acid により抑制されることから、gap-junction の関与も報告されている (Jin *et al.*, 2008)。K⁺ channel は血管平滑筋に広く分布しており、Ca²⁺ 依存性 K⁺ channel、内向き整流性 K⁺ channel、タンデムポア型 K⁺ channel、電位依存性 K⁺ channel の 4 タイプに分類される。その中で、EDHF を介する過分極反応に寄与しているのは、Ca²⁺ 依存性 K⁺ channel あるいは ATP 感受性内向き整流性 K⁺ channel とされる (Standen *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1991)。本章において、非選択的 K⁺ channel 阻害薬である tetraethylammonium 存在下に acetylcholine および A23187 による弛緩反応は抑制された。一方で、ATP 感受性 K⁺ channel 阻害薬である glibenclamide は、いずれの弛緩反応にも影響を与えなかった。従って、マウス腸間膜動脈において、acetylcholine および A23187 による弛緩反応に EDHF が関与しており、Ca²⁺ 依存性 K⁺ channel を介する可能性が高いと考えられる (Fig.28)。

Acetylcholine および A23187 により惹起される EDHF を介する弛緩反応は、血管内皮に存在する gap-junction を介している可能性も考えられる (Chaytor *et al.*, 2002)。EDHF と gap-junction の関係について、Griffith (2004) は、EDHF が内皮細胞内を過分極させ、その電気的変化が内皮細胞 - 平滑筋細胞間にある gap-junction 内を通過して血管平滑筋側に伝播して到達し、血管平滑筋を過分極させて弛緩を起こす機序を提唱している。また、Hutcheson ら (1999) は、acetylcholine による弛緩反応は gap-junction を介し、A23187 による弛緩反応は直接的に細胞外へ EDHF を遊離させるため、Ca²⁺ ionophore による内皮依存性弛緩反応と acetylcholine による弛緩反応は異なると報告している。そこで、マウス腸間膜動脈において、acetylcholine および A23187 誘発弛緩反応が gap-junction に関与しているかどうか 18 α -glycyrrhetic acid 用いて検討した。18 α -glycyrrhetic acid 存在下において、A23187 ではなく acetylcholine によ

る弛緩反応のみが有意に減弱した。従って、acetylcholine による弛緩反応は gap-junction を介する EDHF が関与しており、A23187 により遊離される EDHF とは異なると推察される (Fig.28)。

本章の結果から、マウス腸間膜動脈において、様々な刺激により血管内皮細胞から NO や prostanoids、EDHF の異なる EDRF が遊離され、血管緊張度調節に寄与していることが示唆される (Fig. 28)。また、EDHF を介する弛緩反応は、K⁺ channel だけでなく gap-junction を介する経路もあり、ラット (Jin *et al.*, 2011) とは関係する EDHF が異なることも示唆される。

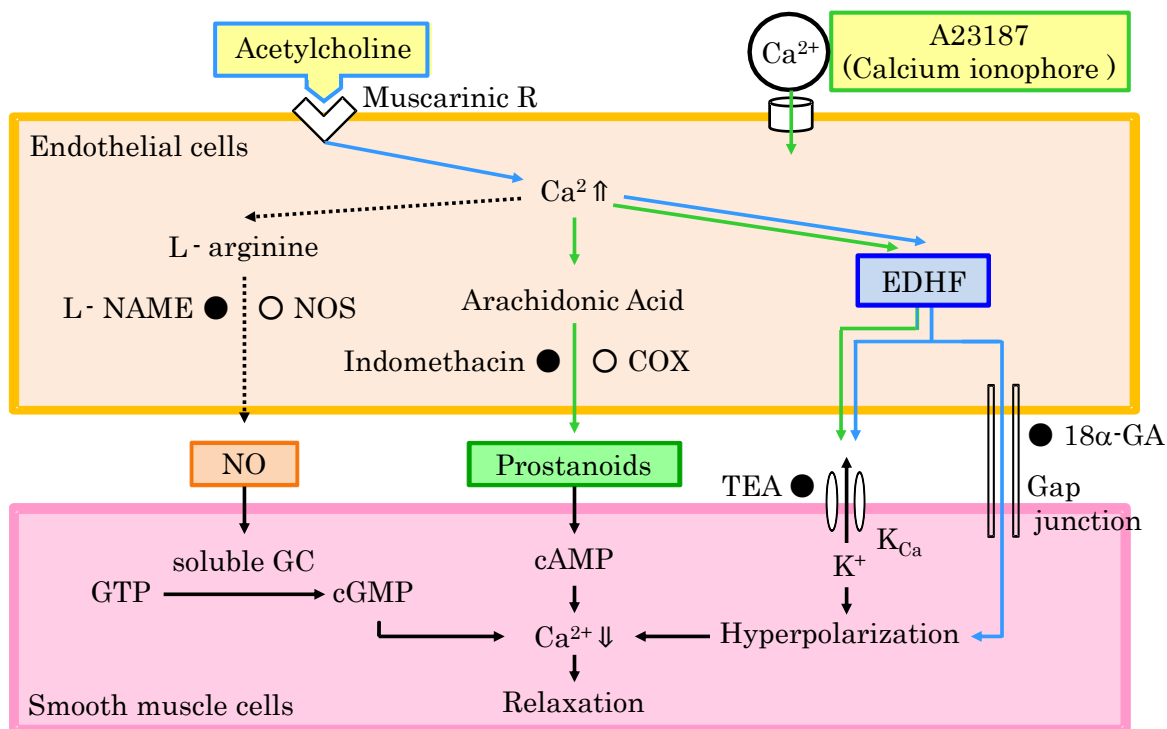


Fig. 28. Possible mechanisms underlying acetylcholine and A23187-induced endothelium-dependent vasodilation in male mouse perfused mesenteric vascular beds. Abbreviations: ●, activation; ○, inhibition; NO, nitric oxide; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; NOS, nitric oxide synthase; COX, cyclooxygenase; L-NAME, N_w-nitro-L-arginine methyl ester; TEA, tetraethylammonium; 18α-GA, 18α-glycyrrhetinic acid; GC, guanylate cyclase; GTP, guanosine triphosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; K_{Ca}, calcium-activated potassium channel.

5. 小括

マウス腸間膜動脈における EDRF の役割についてはほとんど明らかにされておらず、遺伝子操作した病態モデルマウスを用いて血管内皮機能を解析するためには、まだその機能についての報告が少なく十分ではない。第三章では EDRF について、内皮依存性弛緩反応を惹起させる acetylcholine および A23187 を用いて検討した。

その結果、以下の知見が得られた。

1. Acetylcholine、SNP および A23187 により用量に依存した血管弛緩反応が観察された。
2. Sodium deoxycholate 処置により血管内皮機能を喪失させた標本において、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応はほぼ消失した。一方で、SNP による弛緩反応に影響は認められず、無処置の標本と同様に弛緩反応が出現した。
3. L-NAME (100 μ M) 存在下において、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応に変化が見られなかったのに対し、L-NAME (500 μ M) 存在下では有意に抑制された。一方、SNP による血管弛緩反応は L-NAME (100 μ M) 存在下に軽度の増大が認められた。
4. Indomethacin (1 μ M) 存在下において、acetylcholine および SNP による血管弛緩反応に影響はみられなかったが、A23187 による血管弛緩反応は有意に抑制された。
5. Tetraethylammonium (5 mM) 存在下において、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応は有意に抑制された。しかし、SNP による血管弛緩反応に影響はみられなかった。

6. Glibenclamide (10 μ M) 存在下では、acetylcholine および A23187、SNP のいずれの血管弛緩反応にも影響はみられなかった。
7. 18 α -glycyrrhetic acid (100 nM) 存在下において、A23187 および SNP による血管弛緩反応に影響はみられなかったが、acetylcholine による血管弛緩反応は有意に抑制された。

以上の結果より、マウス腸間膜動脈において、様々な刺激により血管内皮細胞から NO や prostanoids、EDHF の異なる EDRF が遊離され、血管緊張度調節に寄与していることが示唆される。また、EDHF を介する弛緩反応は、K⁺ channel だけでなく gap-junction を介する経路もあり、ラットとは関係する EDHF が異なることも示唆される。

総括

腸間膜血管床は、抵抗血管を多く含む血管床であり、その血流の変化は、全身血圧にも影響する。血管の緊張度は主に血管収縮性の交感神経活動の増減によって調節されていることが知られている。また、腸間膜動脈血管床は、腹腔内にあるために摘出が容易で、多くの血管研究に用いられている。しかしながら、腸間膜動脈を含む多くの血管が自律神経とは異なった非アドレナリン・非コリン作動性 (non-adrenergic non-cholinergic; NANC) 神経の神経支配を受けていることが明らかにされている。ラット腸間膜動脈では、NANC 神経の主要な神経伝達物質はカルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) であり、CGRP 含有神経 (CGRPergic nerves) と呼ばれる。CGRP 含有神経は、交感神経と共に血管緊張を調節していることが明らかにされている。しかし、糖尿病や高血圧における血管周囲神経の機能については、そのエビデンスが十分ではない。15%フルクトースを飲水として長期間負荷することで人為的に糖尿病の前症状であるインスリン抵抗性を惹起させたモデルであるフルクトース飲水負荷ラット (fructose drinking rats; FDR) の特徴として、インスリン抵抗性ととも高血圧を併発する。FDR の腸間膜動脈灌流標本を用いた研究では、交感神経機能亢進、CGRP 含有神経機能の低下が引き起こされ、これが高血圧発症の原因の一つであると報告されている。しかし、インスリン抵抗性の結果生じる高インスリン血症に長期間暴露された場合の血管機能調節機構の変化については十分に明らかにされていない。そこで、第一章では先天的にインスリン抵抗性および高インスリン血症を呈する Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットの腸間膜動脈血管床を用いて血管周囲神経の機能変化について検討した。

その他にも、様々なラット病態モデルを用いることができれば、神経機能の役割をより詳細に解析できると考えられるが、病態発症には長期間を要し、費用もかかるために繁用されていない。一方、病態発現に関与する遺伝子を操作し、過剰発現あるいは欠損させた病態モデルマウスが確立され、それらを用いて病理学的に血管周囲神経機能についての研究が行われている。しかし、マウスの血管は小さいために、大動脈などの大血管を用いた研究のみであり、血圧の維持に重要な抵抗血管と呼ばれる細動脈や小動脈を用いて緊張度変化をマウ

モデルで研究することは不可能である。腸間膜動脈血管床の灌流標本は、抵抗血管の緊張度変化や神経性の血管緊張度調節を調べることができるが、マウスにおける腸間膜動脈灌流標本についての報告は少ない。そこで、第二章、第三章ではマウス腸間膜動脈血管床を用いて灌流標本を作製し、血管緊張度調節機構を解析するための諸条件の設定を行った。また、ラット腸間膜動脈と同様に血管周囲交感神経および血管周囲 CGRP 含有神経を介した血管反応、内皮依存性弛緩反応が観察できるかを血管薬理的に解析した。その結果、以下の成績と結論を得た。

第一章では、インスリン抵抗性および高インスリン血症を呈する OLETF ラットが FDR と同様に高血圧を示し、その背景には交感神経機能の亢進あるいは CGRP 含有神経機能、血管内皮機能の低下が腸間膜動脈血管床を用いた灌流実験において明らかとなった。さらに加齢に伴い病態の進展もみられた。従って、インスリン抵抗性に伴う高インスリン血症病態が血管緊張度調節の異常をきたし、高血圧の進展に寄与していることが示唆された。

第二章では、8~9 週齢の C57BL/6 系雄性マウスを用いて灌流標本を作製し、灌流速度および経壁電気刺激 (PNS) の諸条件を検討した。加えて、ラットと同様に交感神経性および CGRP 含有神経性の血管反応が観察されるか検討した。まず灌流速度を 1~5 mL/min に変化させ、その時の灌流圧変化を測定した。また、血管弛緩薬 papaverine 存在下、同様に灌流圧変化を測定した。さらに、各灌流速度において PNS を行い血管反応を観察した。その結果、灌流速度の上昇に伴い灌流圧も上昇した。しかし、4~5 mL/min 以上の流速では、灌流圧が上下に変動し不安定になった。血管弛緩薬 papaverine による灌流圧の更なる低下は観察されなかったため、静止緊張状態では血管が完全に拡張していることが確認できた。PNS による血管収縮反応は灌流速度の上昇に伴い増大したが、灌流速度が 3 mL/min の時に血管反応がより大きく安定して観察できた。また、パルス幅を 10~50 μ sec に変化させて PNS を行った結果、パルス幅の増大に伴い収縮反応は増大し、パルス幅 30 μ sec の PNS により観察された血管収縮反応は、神経毒である tetrodotoxin および交感神経遮断薬 guanethidine、 α_1 アドレナリン受容体拮抗薬 prazosin 存在下で消失した。一方で、パルス幅 50 μ sec の PNS による収縮反応は抑制されたが残存した。従って、マウス腸間膜動脈灌流標本の灌流速度は 3 mL/min、刺激条件はパルス幅 30 μ sec が最適であると判断

した。また、パルス幅 30 μ sec による収縮反応は、主に α_1 アドレナリン受容体を介した交感神経性の反応であることが示唆された。

血管弛緩反応は、 α_1 アドレナリン受容体作動薬 methoxamine および交感神経の影響を除くために交感神経遮断薬 guanethidine を用い、あらかじめ灌流圧を上昇させた後で PNS および acetylcholine、sodium nitroprusside (SNP)、CGRP による血管反応を観察した。Acetylcholine、SNP により一過性の弛緩反応が、PNS および CGRP により持続した弛緩反応が観察できた。また、PNS による弛緩反応は、tetrodotoxin および CGRP₁ 受容体拮抗薬 CGRP8-37 存在下、あるいは capsaicin 処置した標本において消失したことから、CGRP 含有神経性の反応であることが示唆された。さらに、マウス腸間膜動脈および静脈において、免疫組織化学的手法を用いることで、TH 免疫陽性線維および CGRP 免疫陽性線維が血管周囲を網目状に取り巻いて外膜層に分布していることが観察できた。TH 免疫陽性線維は 6-OHDA 処置により、CGRP 免疫陽性線維は capsaicin 処置により消失した。以上の結果より、マウス腸間膜動脈において血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、PNS によりこれら両神経を介する血管反応を観察できることが明らかとなった。また、ラット腸間膜動脈と同様に血管周囲神経が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第三章では、内皮由来弛緩因子 (EDRF) について内皮依存性弛緩反応を惹起させる acetylcholine および A23187 を用いて検討した。あらかじめ灌流圧を上昇させた標本において、acetylcholine により一過性の短い弛緩反応、A23187 により持続した弛緩反応が生じた。しかし、sodium deoxycholate 処置により血管内皮機能を喪失させた標本では、これら両弛緩反応はほぼ消失したことから、acetylcholine および A23187 は血管内皮に依存した弛緩反応を惹起させると考えられる。次に以下の阻害薬を用いて、内皮依存性弛緩反応に関与する EDRF を検討した。非選択的 nitric oxide synthase (NOS) 阻害薬 L-NAME (100 μ M) 存在下では、acetylcholine および A23187 による血管弛緩反応は変化が見られなかったのに対し、L-NAME (500 μ M) 存在下では有意に抑制された。非選択的 cyclooxygenase (COX) 阻害薬 indomethacin 存在下、A23187 による血管弛緩反応は有意に抑制された。非選択的 K⁺ channel 阻害薬 tetraethylammonium 存在下、acetylcholine および A23187 による弛緩反応は有意に抑制されたが、

ATP 感受性 K^+ channel 阻害薬 glibenclamide 存在下では、acetylcholine および A23187 による弛緩反応には影響はみられなかった。Gap-junction 阻害薬 18 α -glycyrrhetic acid 存在下、acetylcholine による弛緩反応は有意に抑制された。以上の結果より、マウス腸間膜動脈において、様々な刺激により血管内皮細胞から NO や prostanoids、EDHF の異なる EDRF が遊離され、血管緊張度調節に寄与していることが示唆された。また、EDHF を介する弛緩反応は、 K^+ channel だけでなく gap-junction を介する経路もあり、ラットとは関与する EDHF が異なることも示唆された。

本研究の成果は、インスリン抵抗性およびそれに伴う高インスリン血症では、高血圧が進展し、その背景には交感神経機能の亢進あるいは CGRP 含有神経機能の低下、血管内皮機能の低下が生じることを、生体内でも大きな血管床であり全身血圧にも影響を与えるラット腸間膜動脈灌流標本において示唆したものである。さらに、遺伝子改変にて病態モデルを作成しやすいマウスでも同様な腸間膜動脈標本を作成することが可能であることを明らかにし、血管周囲神経の機能を評価するにあたり最適な灌流速度および経壁電気刺激の諸条件を設定して、評価系の確立に貢献したものである。さらに、マウス腸間膜動脈においても血管収縮性の交感神経と血管拡張性の CGRP 含有神経が密に分布し、また、血管内皮細胞から NO や prostanoids、 K^+ channel や gap-junction を介する EDHF が産生され、様々な因子が血管緊張度調節に重要な役割を果たしていることを明らかにした。今後も様々な病態モデルマウスを用いることで、より多くの疾患の解析や血管緊張度調節のメカニズムの解析に役立つと考えられる。

参考文献

- Bevan JA: Control of peripheral vascular resistance. evidence based on the in vitro study of resistance arteries. *Clin Invest Med*. 1987; 10: 568–72.
- Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Félétou M, Gödecke A, Huang PL, *et al*. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wildtype and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 9747–9752.
- Chambell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ Res*. 1996; 78: 415–423.
- Chaytor AT, Taylor HJ, Griffith TM. Gap junction-dependent and -independent EDHF-type relaxations may involve smooth muscle cAMP accumulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002; 282: H1548–H1555.
- Chen G, Yamamoto Y, Miwa K, Suzuki H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am J Physiol*. 1991; 260: H1888–H1892.
- Cusma-Pelógia N, Oliveira SF, Nigro D, de Carvalho MH, Scivoletto R, Fortes ZB. Endothelium inactivation in in vitro perfused vascular beds. Comparison of methods. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993; 29: 157–163.
- DeFronzo RA. Is insulin resistance atherogenic? Possible mechanisms. *Atherosclerosis*. 2006; 7: 11–15.
- De Mey JG, Megens R, Fazzi GE. Functional antagonism between endogenous neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide in mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324: 930–937.

De Mey JG, Vanhoutte PM. Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res.* 1982 ; 51: 439–447.

Donoso MV, Steiner M and Huidobro-Toro JP. BIBP3226, suramin and prazosin identify neuropeptide Y, adenosine 5'-triphosphate and noradrenaline as sympathetic cotransmitters in the rat arterial mesenteric bed. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997; 282: 691–698.

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998; 396: 269–272.

Fitzgerald SM, Bashari H, Cox JA, Parkington HC, Evans RG. Contributions of endothelium-derived relaxing factors to control of hindlimb blood flow in the mouse in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 293: H1072–H1082.

Fujiwara H, Wake Y, Hashikawa-Hobara N, Makino K, Takatori S, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor-mediated vasodilation in mouse mesenteric vascular beds. *J Pharmacol Sci.* 2012; 118: 373–381.

Fujiwara H, Hashikawa-Hobara N, Wake Y, Takatori S, Goda M, *et al.* Neurogenic vascular responses in male mouse mesenteric vascular beds. *J Pharmacol Sci.* 2012; 119: 260–270.

Fukamizu A, Sugimura K, Takimoto E, Sugiyama F, Seo MS, *et al.* Chimeric renin-angiotensin system demonstrates sustained increase in blood pressure of transgenic mice carrying both human renin and human angiotensinogen genes. *J Biol Chem.* 1993; 268: 11617–11621.

Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980; 288: 373–376.

Grant AD, Tam CW, Lazar Z, Shih MK, Brain SD. The calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor antagonist BIBN4096BS blocks CGRP and adrenomedullin vasoactive responses in the microvasculature. *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 1091–1098.

Green DJ, Maiorana AJ, Tschakovsky ME, Pyke KE, Weisbrod CJ, O'Driscoll G. Relationship between changes in brachial artery flow-mediated dilation and basal release of nitric oxide in subjects with type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H1193–H1199.

Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol.* 2004; 141: 881–903.

Grundy SM, Becker D, Clark LT, Cooper RS, Denke MA, *et al.* Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106: 3143–3421.

Guan BC, Si JQ, Jiang ZG. Blockade of gap junction coupling by glycyrrhetic acids in guinea pig cochlear artery: a whole-cell voltage- and current-clamp study. *Br J Pharmacol.* 2007; 151: 1049–1060.

Haddock RE, Hill CE. Sympathetic overdrive in obesity involves purinergic hyperactivity in the resistance vasculature. *J Physiol.* 2011; 589: 3289–3307.

Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes.* 1992; 41: 715–722.

Han SP, Naes L, Westfall TC. Inhibition of periarterial nerve stimulation-induced vasodilation of the mesenteric arterial bed by CGRP (8-37) and CGRP receptor desensitization. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168: 786–791.

Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, Akiyama S, Nawa H, *et al.* Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006; 316: 490–497.

Hobara N, Nakamura A, Ohtsuka A, Narasaki M, Shibata K, *et al.* Distribution of adrenomedullin-containing perivascular nerves in the rat mesenteric artery. *Peptides.* 2004; 25: 589–599.

Hobara N, Goda M, Kitamura Y, Takayama F, Kawasaki H. Innervation and functional changes in mesenteric perivascular calcitonin gene-related peptide and neuropeptideY-containing nerves following topical phenol treatment. *Neuroscience.* 2006; 141: 1087–1099.

Hutcheson IR, Chaytor AT, Evans WH, Griffith TM. Nitric oxide independent relaxations to acetylcholine and A23187 involve different routes of heterocellular communication. Role of Gap junctions and phospholipase A2. *Circ Res.* 1999; 84: 53–63.

Iwatani Y, Kosugi K, Isobe-Oku S, Atagi S, Kitamura Y, Kawasaki H. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. *Br J Pharmacol.* 2008; 154: 32–40.

Jin SX, Shen LH, Nie P, Yuan W, Hu LH, *et al.* Endogenous renovascular hypertension combined with low shear stress induces plaque rupture in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 2372–2379.

Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, Koyama T, Sun P, *et al.* Characterization of the inhibitory effect of vascular endothelium on agonist-induced vasoconstriction in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108: 95–103.

Jin X, Otonashi-Satoh Y, Zamami Y, Hobara N, Koyama T, *et al.* Age-related disappearance of the inhibitory effect of vascular endothelium on agonist-induced vasoconstriction in rat mesenteric vascular beds. *J*

Pharmacol Sci. 2009; 111: 372–380.

Jin X, Otonashi-Satoh Y, Zamami Y, Koyama T, Sun P, *et al.* [Endothelial modulation of agonist-induced vasoconstriction in mesenteric microcirculation]. *Yakugaku Zasshi.* 2010; 130: 723–728. (text in Japanese with English abstract)

Jin X, Amitani K, Zamami Y, Takatori S, Hobara N, *et al.* Ameliorative effect of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaves extract (ELE) on insulin resistance and abnormal perivascular innervation in fructose-drinking rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 128: 672–678.

Jin X, Satoh-Otonashi Y, Zamami Y, Takatori S, Hashikawa-Hobara N, *et al.* New molecular mechanisms for cardiovascular disease: contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor in the regulation of vasoconstriction in peripheral resistance arteries. *J Pharmacol Sci.* 2011; 116: 332–336.

Kashyap SR, DeFronzo RA. The insulin resistance syndrome: physiological consideration. *Diab Vasc Dis Res.* 2007; 4: 13–19.

Katki KA, Supowit SC, DiPette DJ. Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in Dahl-salt hypertension. *Hypertension.* 2001; 38: 679–682.

Kawasaki H, Takasaki K, Saito A, Goto K. Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat. *Nature.* 1988; 335: 164–167.

Kawasaki H, Saito A, Takasaki K. Age-related decrease of calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator innervation in the mesenteric resistance vessel of the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1990a; 67: 733–743.

Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990b; 252: 403–409.

Kawasaki H, Saito A, Takasaki K. Changes in calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing vasodilator nerve activity in hypertension. *Brain Res.* 1990c; 518: 303–307.

Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries. *Am J Physiol.* 1991; 261: H683–H690.

Kawasaki H, Eguchi S, Miyashita S, Chan S, Hirai K, *et al.* Proton acts as a neurotransmitter for nicotine-induced adrenergic and calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 330: 745–755.

Kawamura K, Ando K, Takebayashi S. Perivascular innervation of the mesenteric artery in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1989; 14: 660–665.

Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 154: 236–244.

Kobayashi Y, Hirawa N, Tabara Y, Muraoka H, Fujita M, *et al.* Mice lacking hypertension candidate gene ATP2B1 in vascular smooth muscle cells show significant blood pressure elevation. *Hypertension.* 2012; 59: 854–860.

Kong JQ, Taylor DA, Fleming WW. Functional distribution and role of alpha-1 adrenoceptor subtype in the mesenteric vasculature of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; 268: 1153–1159.

Koyama T, Hatanaka Y, Goda M, Zamami Y, Hobara N, Kawasaki H. [Functional alteration of nervous system in renovascular hypertension]. *Yakugaku Zasshi.* 2009; 129: 185–189. (text in Japanese with English abstract)

Lee TS, Sarwinski S, Ishine T, Lai CC, Chen FY. Inhibition of cerebral neurogenic vasodilation by L-glutamine and nitric oxide synthase inhibitors and its reversal by L-citrulline. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 276: 353–358.

Lissner L, Bengtsson C, Lapidus L, Kristjansson K, Wedel H. Fasting insulin in relation to subsequent blood pressure changes and hypertension in women. *Hypertension.* 1992; 20: 797–801.

Lundberg JM. Pharmacology of cotransmission in the autonomic nervous system: integrative aspects on amines, neuropeptides, adenosine triphosphate, amino acids and nitric oxide. *Pharmacol Rev.* 1996; 48: 113–178.

Martínez-Salas SG, Campos-Peralta JM, Pares-Hipolito J, Gallardo-Ortíz IA, Ibarra M, Villalobos-Molina R. Alpha1Adrenoceptors predominate in the control of blood pressure in mouse mesenteric vascular bed. *Auton Autacoid Pharmacol.* 2007; 27: 137–142.

Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, *et al.* Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1521–1530.

Meeking DR, Cummings MH, Thorne S, Donald A, Clarkson P, *et al.* Endothelial dysfunction in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *Diabet Med.* 1999; 16: 841–847.

Mimaki Y, Kawasaki H, Okazaki M, Nakatsuma A, Araki H, Gomita Y. Involvement of calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors in insulin-induced vasodilatation in mesenteric resistance blood vessels of rats. *Br J Pharmacol.* 1998; 123: 1684–1690.

Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, *et al.* Pivotal role of Cu, Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1871–1879.

Nakata S, Tsutsui M, Shimokawa H, Suda O, Morishita T, *et al.* Spontaneous myocardial infarction in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Circulation*. 2008; 117: 2211–223.

Narahashi T. Tetrodotoxin: a brief history. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2008; 84: 147–154.

Nawa H, Kurosaki Y, Kawasaki H. Different prostanoids are involved in bradykinin-induced endothelium-dependent and –independent vasoconstriction in rat mesenteric resistance arteries. *J Pharmacol Sci*. 2004; 94: 115–121.

Nilsson H, Goldstein M, Nilsson O. Adrenergic innervation and neurogenic response in large and small arteries and veins from the rat. *Acta Physiol Scand*. 86; 126: 121–133.

Nuki C, Kawasaki H, Takasaki K, Wada A. Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat resistance vessels. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 268: 59–64.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327: 524–526.

Pérez-Rivera AA, Hlavacova A, Rosario-Colón LA, Fink GD, Galligan JJ. Differential contributions of alpha-1 and alpha-2 adrenoceptors to vasoconstriction in mesenteric arteries and veins of normal and hypertensive mice. *Vascul Pharmacol*. 2007; 46: 373–382.

Pomposiello S, Rhaleb NE, Alva M, Carretero OA. Reactive oxygen species: role in the relaxation induced by bradykinin or arachidonic acid via EDHF in isolated porcine coronary arteries. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34: 567–574.

Ralevic V, Mathie RT, Alexander B, Burnstock G. NG-nitro-Larginine methyl ester attenuates vasodilator responses to acetylcholine but enhances those to sodium nitroprusside. *J Pharm Pharmacol*. 1991; 43: 871–874.

Rosenblum WI, McDonald M, Wormley B. Calcium ionophore and acetylcholine dilate arterioles on the mouse brain by different mechanisms. *Stroke*. 1989; 20: 1391–1395.

Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaike R, *et al*. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endotheliumdependent relaxations in rat mesenteric circulation. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996; 28: 703–711.

Shiraki H, Kawasaki H, Tezuka S, Nakatsuma A, Kurosaki Y. Endogenous calcitonin gene-related peptide (CGRP) mediates adrenergic-dependent vasodilation induced by nicotine in mesenteric resistance arteries of the rat. *Br J Pharmacol*. 2000; 130: 1083–1091.

Shiraki H, Kawasaki H, Tezuka S, Nakatsuma A, Nawa H, *et al*. Adrenergic nerves mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in the rat mesenteric resistance artery. *Eur J Pharmacol*. 2001; 419: 231–242.

Skarfors ET, Selinus KI, Lithell HO. Risk factors for developing non-insulin dependent diabetes: a 10 year follow up of men in Uppsala. *BMJ*. 1991; 303: 755–760.

Smillie SJ, King R, Kodji X, Outzen E, Pozsgai G, *et al*. An ongoing role of α -calcitonin gene-related peptide as part of a protective network against hypertension, vascular hypertrophy, and oxidative stress. *Hypertension*. 2014; 63:1056–1062.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science*. 1989; 245: 177–180.

Takaki A, Morikawa K, Tsutsui M, Murayama Y, Tekes E, *et al.* Crucial role of nitric oxide synthases system in endothelium-dependent hyperpolarization in mice. *J Exp Med.* 2008; 205: 2053–2063.

Takatori S, Zamami Y, Mio M, Kurosaki Y, Kawasaki H. Chronic hyperinsulinemia enhances adrenergic vasoconstriction and decreases calcitonin gene-related peptide-containing nerve-mediated vasodilation in pithed rats. *Hypertens Res.* 2006; 29: 361–368.

Takatori S, Zamami Y, Yabumae N, Hanafusa N, Mio M, *et al.* Pioglitazone opposes neurogenic vascular dysfunction associated with chronic hyperinsulinaemia. *Br J Pharmacol.* 2008; 153: 1388–1398.

Takatori S, Zamami Y, Hashikawa-Hobara N, Kawasaki H. Insulin resistance-induced hypertension and a role of perivascular CGRPergic nerves. *Curr Protein Pept Sci.* 2013; 14: 275–281.

Takatori S, Fujiwara H, Zamami Y, Hashikawa-Hobara N, Kawasaki H. Decreased perivascular CGRP-containing nerves in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats with insulin resistance and hypertension. *Hypertens Res.* 2014; 37: 398–404

Takenaga M, Kawasaki H, Wada A, Eto T. Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat. *Circ Res.* 1995; 76: 935–941.

Takenaga M, Kawasaki H. Endogenous calcitonin gene-related peptide suppresses vasoconstriction mediated by adrenergic nerves in rat mesenteric resistance blood vessels. *Eur J Pharmacol.* 1999; 367: 239–245.

Tangsucharit P, Takatori S, Sun P, Zamami Y, Goda M, *et al.* Do cholinergic nerves innervating rat mesenteric arteries regulate vascular tone? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012; 303: 1147–1156.

Tam CW, Husmann K, Clark NC, Clark JE, Lazar Z, *et al.* Enhanced vascular responses to adrenomedullin in mice overexpressing receptor-activity-modifying protein 2. *Circ Res.* 2006; 98: 262–270.

Timponi CF, Oliveira NE, Arruda RM, Meyrelles SS, Vasquez EC. Effects of the local anaesthetic ropivacaine on vascular reactivity in the mouse perfused mesenteric arteries. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006; 98: 518–520.

Toda N, Okamura T. Mechanism underlying the response to vasodilator nerve stimulation in isolated dog and monkey cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1511–H1517.

Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, Matsushita H, Yamaguchi T, *et al.* Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 16702–16707

Waldron GJ, Cole WC. Activation of vascular smooth muscle K⁺ channels by endothelium-derived relaxing factors. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999; 26: 180–184.

Wang LH, Luo M, Wang Y, Galligan JJ, Wang DH. Impaired vasodilation in response to perivascular nerve stimulation in mesenteric arteries of TRPV1-null mutant mice. *J Hypertens.* 2006; 24: 2399–2408.

Williams TJ and Clark DE. Characterization of α 1-adrenoceptors mediating vasoconstriction to noradrenaline and nerve stimulation in the isolated perfused mesentery of rat. *Br J Pharmacol.* 1995; 114: 531–536.

Yabek SM, Avner BP. Effects of prostacyclin (PGI₂) and indomethacin on neonatal lamb mesenteric and renal artery responses to electrical stimulation and norepinephrine. *Prostaglandins.* 1980; 19: 23–29.

Yamamoto R, Wada A, Asada Y, Yuhi T, Yanagita T, *et al.* Functional relation between nitric oxide and noradrenaline for the modulation of vascular tone

in rat mesenteric vasculature. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1994; 349: 362–366.

Yu HI, Sheu WH, Lai CJ, Lee WJ, Chen YT. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus subjects with peripheral artery disease. *Int J Cardiol.* 2001; 78: 19–25.

Zamami Y, Takatori S, Hobara N, Yabumae N, Tangsucharit P, *et al.* Hyperinsulinemia induces hypertension associated with neurogenic vascular dysfunction resulting from abnormal perivascular innervations in rat mesenteric resistance arteries. *Hypertens Res.* 2011; 34: 1190–1196.

Zhang W, Edvinsson L, Lee TJ. Mechanism of nicotine-induced relaxation in the porcine basilar artery. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284: 790–797.