

摘出イヌ腎動脈の血管収縮ならびに弛緩反応に おける内皮細胞の役割

伊 藤 澄 信

信州大学医学部第1生理学教室
(主任 大橋俊夫教授)

Role of Endothelial Cells in the Vasoconstrictive and Vasodilatory Responses to Vasoactive Substances in the Isolated Canine Renal Artery

Suminobu ITOH

Department of Physiology, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Toshio OHASHI)

The purpose of present study was to evaluate the role of endothelial cells in the vasoconstrictive and vasodilatory responses of isolated normal and everted cylindrical preparations of canine renal arteries. Administration of norepinephrine (NE) and epinephrine (EP) from the intimal side in both preparations caused a more marked decrease of the outer diameter than did administration from the adventitial side. The response curve to NE was not significantly affected by 10^{-7} M propranolol, 10^{-7} M cocaine and 10^{-6} M hydrocortisone. Responses to NE, EP, 5-hydroxytryptamine (5-HT) and prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) in the everted preparation were not modified by removing the endothelial cells. Addition of acetylcholine (ACh) from the intimal or adventitial side caused a dose-dependent increase of the outer diameter. The ACh-induced vasodilatory response was competitively antagonized by pretreatment with 10^{-7} M atropine. The ACh-induced vasodilatory response was completely abolished, and was changed to a vasoconstrictive response, by rubbing the endothelial cells. The vasodilatory response produced by low concentrations of isoproterenol was also significantly reduced. These results suggest that NE, EP, 5-HT and $PGF_{2\alpha}$ -induced vasoconstrictions are independent of the endothelial cells in the isolated canine renal artery, and that the vasodilations induced by ACh and isoproterenol require the presence of functional endothelial cells, which, when exposed to these substances, initiate an inhibitory signal for the smooth muscle cells of the media. *Shinshu Med. J.*, 33: 522-538, 1985

(Received for publication August 13, 1985)

Key words: canine renal artery, cylindrical and everted preparation, vascular endothelial cell, vasoconstrictive drug, vasodilatory drug

イヌ腎動脈, 円筒状ならびに反転標本, 血管内皮細胞, 血管収縮物質, 血管弛緩物質

I はじめに

Furchgott と Zawadzki は acetylcholine によるウサギ大動脈平滑筋の弛緩反応に血管内皮細胞が必要不可欠であり、ある化学伝達物質を介してその反応が惹起されることを報告した¹⁾。その後、adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), calcium ionophore, substance P, bradykinin などによる動脈平滑筋の弛緩反応にも内皮細胞の関与していることが明らかにされてきた²⁾⁻⁸⁾。また、ラット大動脈標本やウサギ冠動脈標本では norepinephrine や 5-hydroxytryptamine による収縮反応が内皮細胞剝離によって増強され、生理的状态において内皮細胞が収縮反応をも制御している可能性が報告されてきた⁹⁾⁻¹²⁾。しかし、これらの報告はほとんどすべて摘出条片を用いており、薬物の作用経路を規定できないなどの問題点を含んでいる。

そこで本研究では、摘出したイヌ腎動脈の正常ならびに反転標本を用い、内腔と外側を別々に灌流する実験系を作製し、各種生理活性物質に対する反応性を解析した。さらに、内皮細胞を擦過、剝離した反転標本を用いて、血管作動物質に対する反応性を比較検討し血管反応性における血管内皮細胞の役割について考察を加えた。あわせて、われわれの用いたろ紙による内皮剝離法の妥当性について、形態学的方法を用いて検討した。

II 実験方法

A 薬物反応の検索

体重7~20kg の雑種成犬126頭を雌雄の別なく用いた。Sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.) で麻酔後、脱血屠殺した。死後ただちに外径3~5mm の腎動脈を摘出し、結合組織を丁寧に剝離後、小分枝をすべて結紮し正常円筒状標本を作製した。図1に示すように標本は生体長に伸展し、容量10ml の臓器槽に装着した。標本内腔は灌流ポンプ (Harvard 1210) とスターリングの空気抵抗を用いて、norepinephrine 投与時に最大外径変化の得られる¹³⁾ 80 mmHg で定圧灌流した。灌流保生液には37°C に加温した Krebs 液 (組成 [mM]: NaCl 120.0, KCl 5.9, NaHCO₃ 25.0, NaH₂PO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, glucose 5.5) を用いた。この保生液には実験中たえず95%O₂ + 5%CO₂ 混合ガスの通気を行い、pH を7.4~7.5に維持した。標本外側も内腔と同じ流量 (3.2ml/min) で上記と同一条件の保生液を灌流した。灌流圧は圧力トランスデューサ (東洋ポールドウィン MPU 0.5-290) を用い、また流量はわれわれの作製した滴数計により持続的に監視した。血管平滑筋の反応性は標本の外径変化を指標として測定し、レクチレコーダー (日本電気三栄 RECTI-HORITZ 8K) に記録した。標本外径の変化は Sakaguchi ら¹⁴⁾ が開発したイメージセンサ (松下電子 MEL512K) を用いた非接触型血管外径

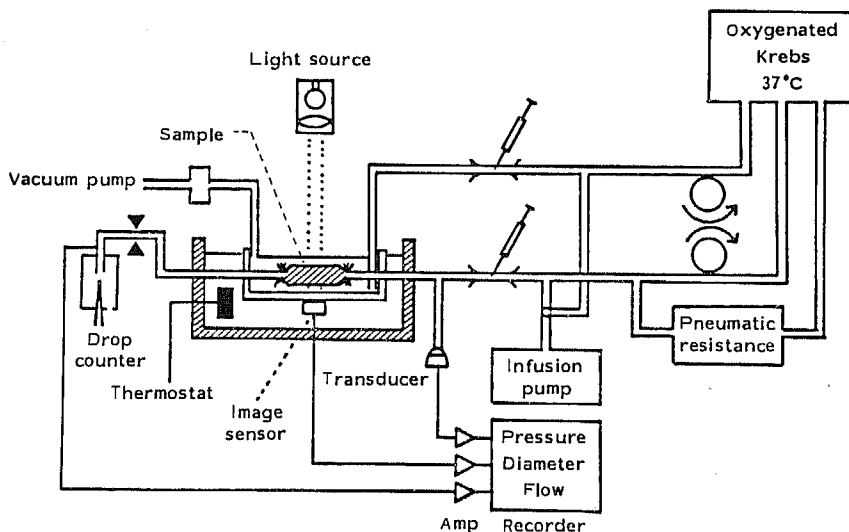


図1 実験装置の模式図

測定装置を使用した。薬物投与実験は標本装着後1時間以上放置し、標本の反応性が安定してから行った。内皮細胞の剝離実験はすべて反転標本を用いて行った。まず、内皮細胞が正常状態の反転標本で対照の薬物投与実験を行った。その後、標本を臓器槽に装着したまま内皮細胞を、Furchgott と Zawadzki¹⁾ の原法に従ってろ紙で機械的に剝離し、同様の薬物投与実験を行った。この場合も内皮細胞剝離後1時間以上標本を安定させてから実験を行った。血管弛緩物質に対する反応性の検索には、正常ならびに反転標本いずれも標本外膜側に $8 \times 10^{-6} \text{M}$ prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) を含んだ標準保生液を持続灌流し、血管平滑筋を収縮させ、基本外径の 10-20%短縮状態にある血管標本を用いて実験を行った。薬物は注入ポンプ (Harvard 901) あるいはマイクロシリンジを用いて標本内腔あるいは外側に別々に投与した。特に血管収縮物質の投与にあたっては、標本内腔ならびに外側の薬物濃度が一定になるように、両者の容量を考慮しながら注入ポンプの注入速度を調節した。拮抗物質を用いた薬理学的受容体解析の実験は、実験を開始する30分前より標本内腔、外側をともに一定濃度の拮抗物質を含む標準保生液で灌流し、作用薬の投与実験を行った。特に、 α 遮断剤 (prazosin) の実験結果は Schild のプロット¹⁵⁾ を用いて解析した。

使用した薬物は下記の通りである。dl-norepinephrine hydrochloride (三共), dl-epinephrine hydrochloride (第一製薬), 5-hydroxytryptamine creatinine sulfate (Sigma), prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ (小野薬品), propranolol hydrochloride (住友化学), prazosin hydrochloride (Pfizer), yohimbine hydrochloride (Sigma), cocaine (Duncans Flockhart), hydrocortisone (Sigma), methysergide hydrogen malate (Sandoz), acetylcholine chloride (第一製薬), l-isoproterenol hydrochloride (日研化学), sodium nitroprusside (Merck), atropine sulfate (田辺製薬)。

B 形態学的検索

われわれの用いた、ろ紙による内皮細胞の擦過、剝離法によって血管内皮細胞が完全に剝離されているか否か形態学的に検索した。実験は、イスを脱血屠殺後、ただちに腎動脈を摘出し、内皮細胞を傷つけないように注意しながら軸方向に切開し全体標本作製した。また、反転処理を行ったイス腎動脈も同様の方法で全体標本とした。これら全体標本は伸展し外膜側が裏に

なるようにコルク板上に固定し、標本半側の内皮細胞をろ紙で擦過、剝離した。これらの標本は 5% glucose 溶液で丁寧に内皮細胞面を洗浄後、0.1% 硝酸銀溶液に約 1 分浸潤させた。浸潤後、標本はまた 5% glucose 溶液で洗浄し、4°C に保存した 2.5% glutaraldehyde 溶液で約 1 時間固定した。固定標本には Weigert の鉄ヘマトキシリン染色を施した。固定標本より Poole ら¹⁶⁾ の方法に準じ、中膜を含む小皮標本作製し、光学顕微鏡 (Olympus BH-2) を用いて内皮細胞の有無を検索し、写真撮影を行った。

C 統計処理

各反応量についてそれぞれの平均値と標準誤差を算出した。ED₅₀ 濃度は各標本の用量-反応曲線より最大反応量を求め、その値を 100% とし、50% 反応量を引きおこす濃度を算出した。さらに Student の t 検定により各反応間の統計学的有意差 ($p < 0.05$) を検定した。

III 実験結果

A 薬物反応の検索

1 血管収縮反応におよぼす内皮細胞の役割

a Norepinephrine

正常円筒状ならびに反転標本の内腔あるいは外側に norepinephrine (NE) を注入ポンプを用いて累積的に投与した (NE 濃度 $0.5 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 投与速度 $0.2 \sim 0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) 実験結果の典型例を図 2 に示す。正常標本の内腔 (図 2 上段左) すなわち内腔側に投与した NE は $1.7 \times 10^{-7} \text{M}$ で血管外径をわずかに短縮させ、用量依存的に ($1.7 \times 10^{-7} \text{M} \sim 1.7 \times 10^{-5} \text{M}$) その短縮量を増加させた。一方、標本外側に投与した NE の閾値濃度は $1.7 \times 10^{-6} \text{M}$ まで上昇した (図 2 上段右)。反転標本 (図 2 下段) の場合も標本内腔に投与した NE より標本外側すなわち内腔側に投与した NE の閾値濃度の方が低く、約 $1.7 \times 10^{-7} \text{M}$ であった。これらの結果を用量-反応曲線を用いてまとめたものが図 3 である。図 3 の横軸は NE の濃度を対数目盛で表示し、縦軸は NE の反応量を薬物投与前の標本外径 (D_0) に対するそれぞれの濃度の最大外径短縮量 ($4D_{\text{max}}$) の比で示した。まず NE 用量-反応曲線の時間依存性について検討した。同一標本において 30 分ごとに繰り返し NE の用量-反応曲線を求めると、1 回目に比べ 2 回目の用量-反応曲線は ED₅₀ 濃度が約 1.5 倍上昇し、最大反応量が基本外径の 3% 程度低下する傾向を示した。しかし、その後、約 6 時

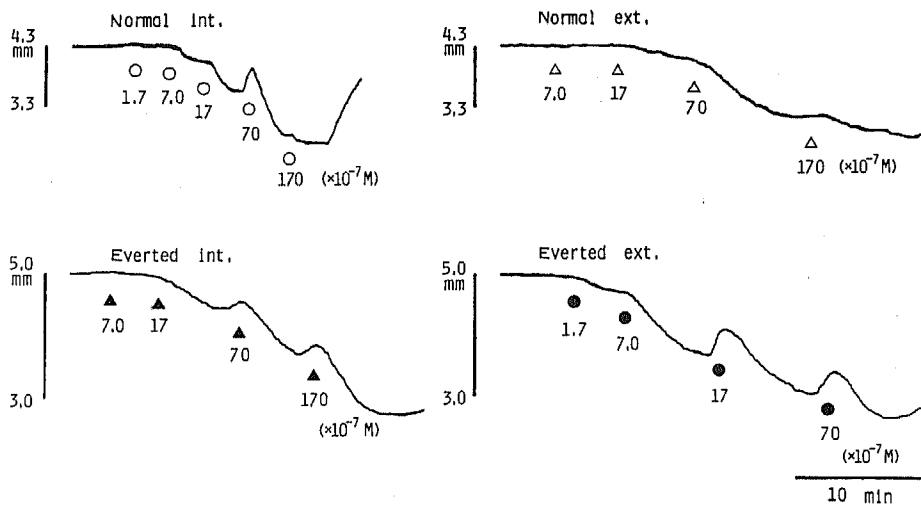


図2 正常ならびに反転標本における内腔・外側投与 norepinephrine (NE)

それぞれの血管径短縮反応の典型例

Normal int.: 正常標本内腔投与例

Normal ext.: 正常標本外側投与例

Everted int.: 反転標本内腔投与例

Everted ext.: 反転標本外側投与例

○△●▲は薬物の投与時点を示す

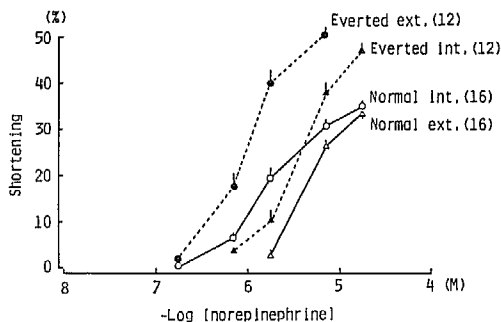


図3 正常ならびに反転標本における内腔・外側投与 NE それぞれの反応における用量一反応曲線 (括弧内の数字は実験例数を示す)

- 正常標本内腔投与群
- △—△ 正常標本外側投与群
-● 反転標本外側投与群
- ▲.....▲ 反転標本内腔投与群

間にわたって、2回目以降の NE の用量一反応曲線はほとんど変化せず一定の曲線が得られた。よって、それぞれの実験では2回目以降に得られた NE の用量一反応曲線を対照曲線として用いた。

実線で示した正常標本の場合、内腔、外側投与それ

ぞれの用量一反応曲線の ED_{50} 濃度は $(1.9 \pm 0.2) \times 10^{-6} M$, $(4.4 \pm 0.2) \times 10^{-6} M$ ($p < 0.001$, $n=16$) であり、用量比は 2.7 ± 0.3 であった。一方、反転標本の場合 (破線)、内腔、外側投与それぞれの ED_{50} 濃度は $(3.9 \pm 0.4) \times 10^{-6} M$, $(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-6} M$ ($p < 0.001$, $n=12$) であり、用量比は 4.4 ± 0.6 であった。また反転標本における最大短縮量は正常標本のそれに比べて有意に大であった ($50.4 \pm 1.5\% : 35.7 \pm 1.0\%$, $p < 0.001$)。

b NE 反応性に対する各種拮抗剤の影響

β 遮断剤 propranolol の影響を比較検討した (図4)。図4の上段は正常標本において propranolol $10^{-7} M$ 処置前後の標本内腔に投与した NE の用量一反応曲線を、下段は外側投与時の同様な実験結果を示した。横軸ならびに縦軸の指標はそれぞれ図3の規準と同じである。両図から判るように、対照群に比べ、propranolol 処置を施した NE の用量一反応曲線は efficacy 増大の傾向を示した。すなわち、 $1.7 \times 10^{-5} M$ NE を標本内腔 (図4上段) に投与したときの短縮量は $31.1 \pm 2.8\%$ から $35.6 \pm 2.7\%$ ($n=6$) へ増加の傾向を示したが、両者の間に有意差は認められなかった。閾値濃度は内腔、外側投与いずれの場合も両群間にお

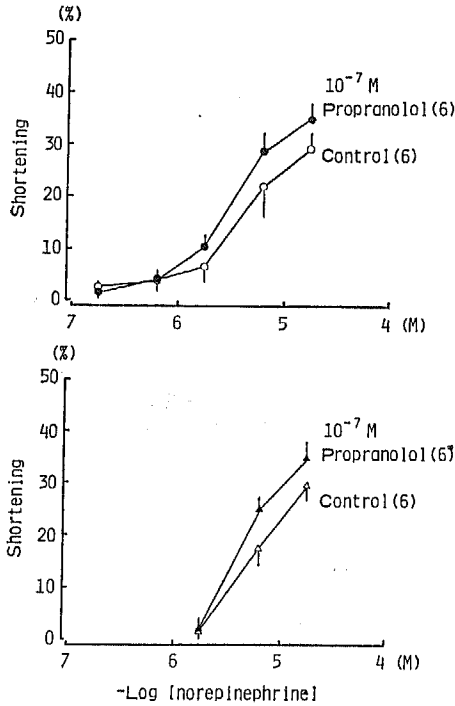
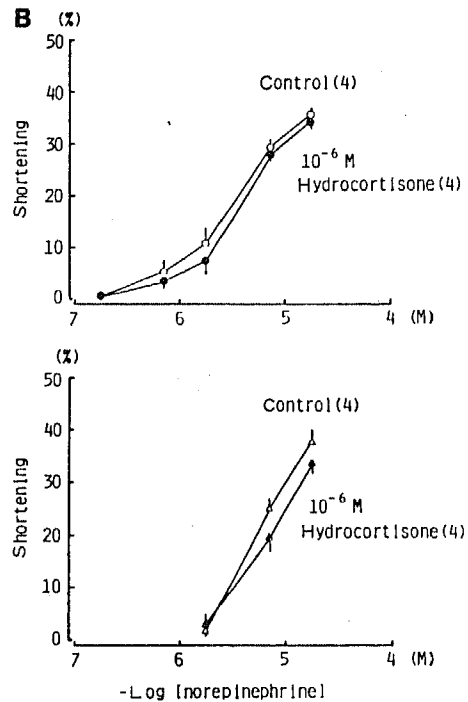
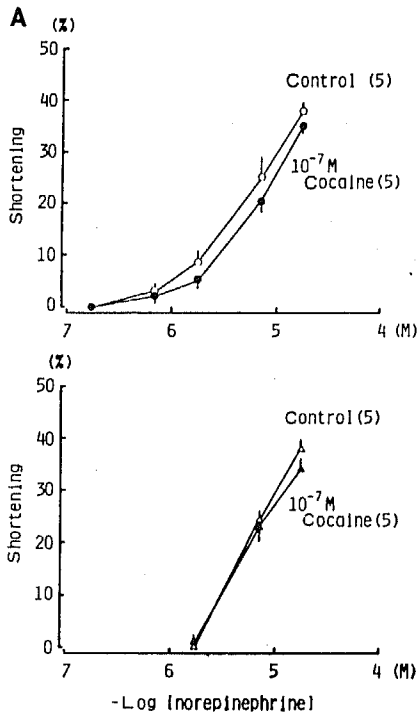


図4 正常標本における内腔(A)ならびに外側投与(B) NE それぞれの用量—反応曲線におよぼす β 遮断剤 propranolol の影響 (n=6)

- NE 内腔投与 対照群
- NE 内腔投与 propranolol (10^{-7} M) 群
- △—△ NE 外側投与 対照群
- ▲—▲ NE 外側投与 propranolol (10^{-7} M) 群

図5 正常標本における内腔 (上段)・外側 (下段) 投与 NE それぞれの用量—反応曲線におよぼす cocaine (A) ならびに hydrocortisone (B) の影響 (括弧内の数字は実験例数を示す)

- NE 内腔投与 対照群
- NE 内腔投与 薬物処理群
- △—△ NE 外側投与 対照群
- ▲—▲ NE 外側投与 薬物処理群



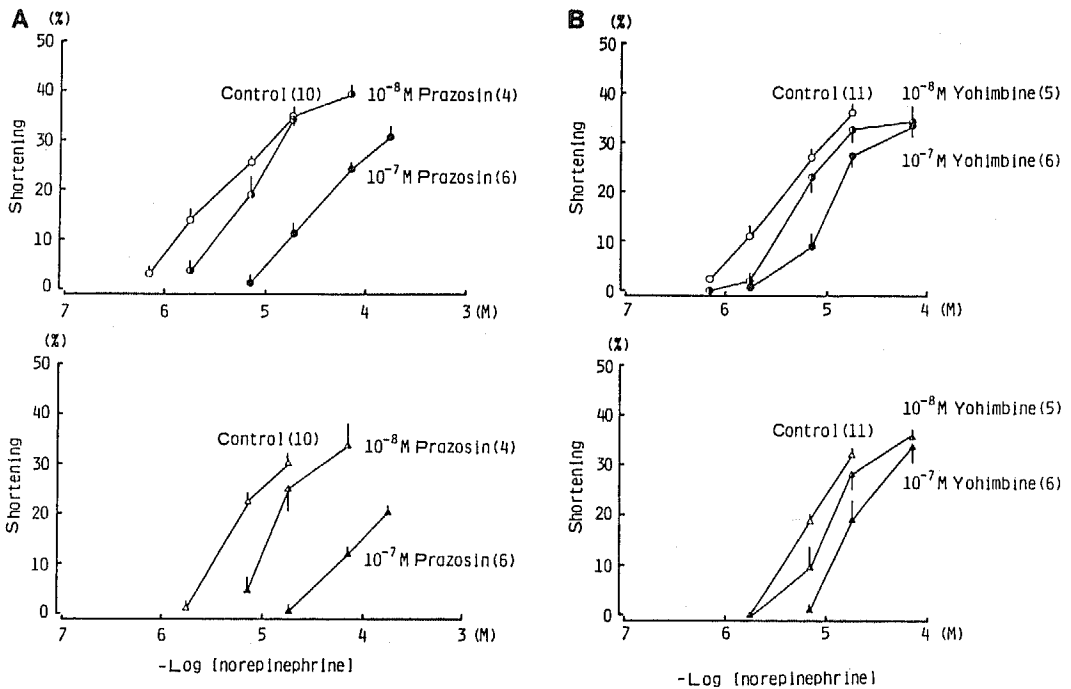


図6 正常標本における内腔(上段)・外側(下段)投与 NE それぞれの用量一反応曲線によらば α_1 選択性遮断剤 prazosin (A)ならびに α_2 選択性遮断剤 yohimbine (B)の影響(括弧内の数字は実験例数を示す)

- NE 内腔投与 対照群
- NE 内腔投与 α 遮断剤 (10^{-8} M) 群
- NE 内腔投与 α 遮断剤 (10^{-7} M) 群
- △—△ NE 外側投与 対照群
- ▲—▲ NE 外側投与 α 遮断剤 (10^{-8} M) 群
- ▲—▲ NE 外側投与 α 遮断剤 (10^{-7} M) 群

いて差異を認めなかった。

交感神経あるいは神経外組織による NE 取り込み作用が標本内腔, 外側に投与した NE 反応性の差異を生じた一因になっているか否かを検討した(図5)。図5の横軸ならびに縦軸の指標は図3と同一である。正常標本の内腔, 外側に神経系への NE 取り込み阻害剤 (uptake₁ blocker) cocaine を 10^{-7} M (図5 A), あるいは神経外 NE 取り込み阻害剤 (uptake₂ blocker) hydrocortisone を 10^{-8} M (図5 B) 前処置しても, 正常標本の NE 用量一反応曲線と対照群のそれとの間に有意な変化は生じなかった。

次にカテコラミン α_1 受容体選択性遮断剤である prazosin と α_2 選択性遮断剤の yohimbine を用いてイヌ腎動脈標本における α 受容体の薬理的検索を

行った。図6 Aは正常標本において prazosin 10^{-8} M, ならびに 10^{-7} M 標本内腔, 外側処置前後の NE の用量一反応曲線を示す。対照群に比べ, 10^{-8} M prazosin 処置後の NE 用量一反応曲線は ED_{50} 濃度の用量比にして内腔(図6 A上段)ならびに外側(図6 A下段)投与で 3.2 ± 1.1 倍, 2.6 ± 0.3 倍 ($n = 4$) 右方へ移動した。 10^{-7} M prazosin 前処置を加えると内腔(図6 A上段), 外側(図6 A下段)投与それぞれの NE 用量一反応曲線は用量比にして 10.7 ± 1.6 倍, 23.6 ± 2.4 倍 ($n = 6$) 右方へ移動した。これらの結果を Schild のプロットを用いて pA_2 と傾きを算出すると, 内腔側 8.18, 0.81 外腔側 8.15, 1.16 であった。正常標本の内腔, 外側に α_2 遮断剤である yohimbine 10^{-8} M, 10^{-7} M の前処置を施し, 同様の実験を行った。その結果を図

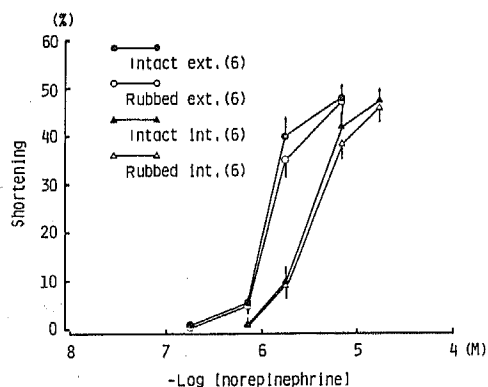


図7 反転標本における内腔(上段)・外側(下段)投与 NE それぞれの用量-反応曲線におよぼす内皮剥離の影響(括弧内の数字は実験例数を示す)

●—● NE 外側投与 対照群
○—○ NE 外側投与 内皮剥離群
▲—▲ NE 内腔投与 対照群
△—△ NE 内腔投与 内皮剥離群

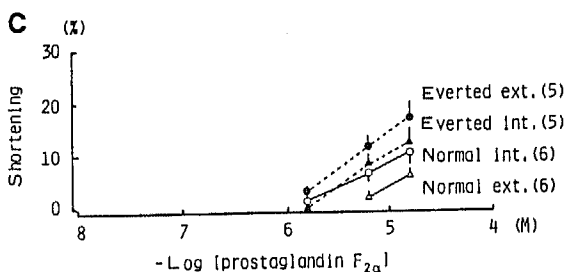
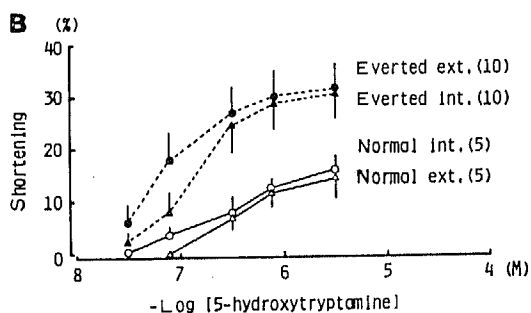
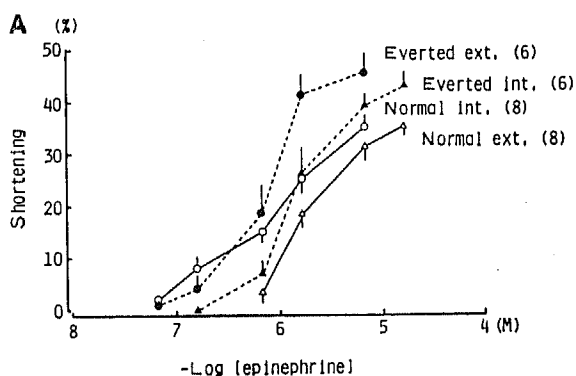


図8 正常ならびに反転標本における内腔, 外側投与 epinephrine(A), 5-hydroxytryptamine (B), prostaglandin $F_{2\alpha}$ (C) それぞれの用量-反応曲線(括弧内の数字は実験例数を示す)

○—○ 正常標本内腔投与群 (Normal int.)
△—△ 正常標本外側投与群 (Normal ext.)
●—● 反転標本外側投与群 (Everted ext.)
▲—▲ 反転標本内腔投与群 (Everted int.)

6 Bに示す。 10^{-8} M yohimbine 処置後の NE 用量—反応曲線は ED_{50} 濃度の用量比で、内腔 (図 6 B上段) ならびに外側 (図 6 B下段) 投与で 2.6 ± 0.8 倍, 1.7 ± 0.4 倍 ($n=5$) 右方へ移動した。しかし, 10^{-7} M yohimbine の前処置を施しても内腔 (図 6 B上段), 外側 (図 6 B下段) 投与それぞれの NE 用量—反応曲線は用量比にして対照の 3.6 ± 1.0 倍, 3.6 ± 1.2 倍 ($n=6$) しか右方へ移動しなかった。

内皮細胞剥離前後の NE の用量—反応曲線を図 7 に示した。実験はまず, 反転標本の内腔, 外側に NE を累積的に投与し, 用量—反応曲線を求めた。次いで同一標本の内皮細胞を擦過, 剥離した後, 同様の方法で NE の用量—反応曲線を作成した。図から明らかに内皮細胞を剥離して, 内膜側 (ED_{50} 濃度 $(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ M : $(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ M, 最大短縮反応量 $48.3 \pm 2.4\%$: $47.7 \pm 3.0\%$) あるいは外膜側 (ED_{50} 濃度 $(3.4 \pm 0.4) \times 10^{-6}$ M : $(4.0 \pm 0.5) \times 10^{-6}$ M, 最大短縮反応量 $47.4 \pm 2.1\%$: $45.9 \pm 2.8\%$) から NE を投与しても, その反応性に有意な差異は認められなかった。同様に 5-HT $PGF_{2\alpha}$ の短縮反応 ($n=2$) も内皮細胞剥離によって影響を受けなかった。

c Epinephrine, 5-hydroxytryptamine, および prostaglandin $F_{2\alpha}$

図 8 Aに epinephrine (EP) の用量—反応曲線を

表す。図 8ABC の縦軸ならびに横軸の指標は図 3 のそれらと同じである。すなわち, 横軸は薬物濃度を対数目盛で表示し, 縦軸は基本外径 (D_0) に対するそれぞれの濃度の最大短縮量 ($4D_{max}$) の比で標本の短縮量を示した。EP (6.5×10^{-8} M ~ 1.6×10^{-5} M) は NE と同様, 正常ならびに反転標本いずれにも用量依存的な短縮反応を惹起した。正常標本の場合, 内腔あるいは外側投与で得られた用量—反応曲線の ED_{50} 濃度はそれぞれ $(8.3 \pm 1.4) \times 10^{-7}$ M, $(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-6}$ M ($p < 0.01$, $n=8$) であった。反転標本より得られたそれぞれの ED_{50} 濃度は $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M, $(7.8 \pm 1.7) \times 10^{-7}$ M ($p < 0.05$, $n=6$) であった。また NE 反応と同様, 反転標本における EP の最大短縮量は正常標本のそれに比べて有意に大であった ($37.4 \pm 2.2\%$: $48.5 \pm 2.5\%$, $p < 0.01$)。図 8 Bに 5-hydroxytryptamine (5-HT) の用量—反応曲線を示す。正常標本の内腔, 外側投与それぞれの用量—反応曲線における ED_{50} 濃度は $(3.6 \pm 0.7) \times 10^{-7}$ M, $(4.2 \pm 0.8) \times 10^{-7}$ M ($n=5$) であり, 反転標本の場合の ED_{50} 濃度はそれぞれ $(2.5 \pm 0.6) \times 10^{-7}$ M, $(1.3 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ M ($n=10$) であった。いずれの標本の場合にも両投与方法による ED_{50} 濃度の間に統計学的有意差は認められなかった。最大短縮反応量は反転標本の方がいずれの薬物投与方法を用いても常に大であった ($31.1 \pm 5.4\%$, $n=10$: $15.7 \pm 2.8\%$, $n=5$, $p < 0.05$)。反転標本に

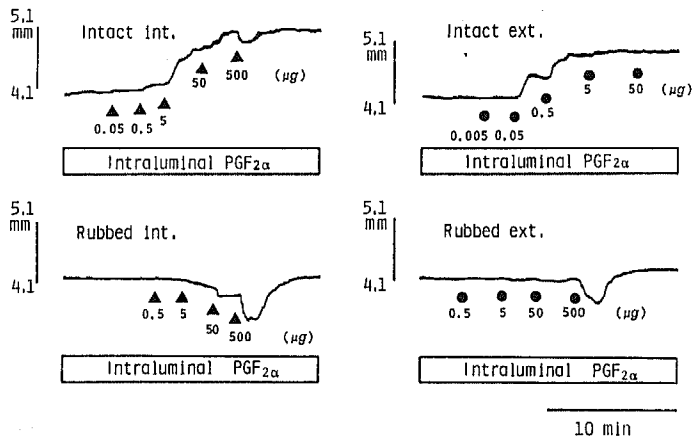


図 9 反転標本における内腔・外側投与 acetylcholine (ACh) それぞれの典型的な血管径伸長例 (上段) と内皮剥離 (下段) の影響

Intact int. : 正常内皮標本内腔投与例

Intact ext. : 正常内皮標本外側投与例

Rubbed int. : 内皮剥離標本内腔投与例

Rubbed ext. : 内皮剥離標本外側投与例

縦軸指標上端 (5.1mmφ) は $PGF_{2\alpha}$ 投与前の標本外径を示し, ▲●は薬物投与時点を示す

における 5-HT の内腔, 外側投与それぞれの用量-反応曲線は 10^{-7} M の methysergide を標本内腔ならびに外側同時に前処置すると, 約 5 倍ほど右方に移動した。図 8 C に prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) の用量-反応曲線を示す。NE, EP, 5-HT の用量-反応曲線同様, 薬物の投与経路のいかんによらず反転標本の方が大きい短縮量を示した ($PGF_{2\alpha} 1.7 \times 10^{-5}$ M 投与時最大短縮量 正常標本 $10.4 \pm 2.0\%$, $n=5$; 反転標本 $17.0 \pm 3.0\%$, $n=6$)。

2 血管弛緩反応に及ぼす内皮細胞の役割

a Acetylcholine

図 9 に反転標本における正常内皮ならびに内皮剝離後の acetylcholine (ACh) の血管径伸長反応の典型例を示した。外膜側に 8×10^{-6} M の $PGF_{2\alpha}$ を含んだ標準保生液を持続灌流し, 拘縮状態にある正常内皮反転標本の内腔に ACh を $0.5 \mu\text{g}$ 投与すると (図 9 上段左), 血管径の増加が認められ, この増加は ACh $0.5 \sim 50 \mu\text{g}$ の範囲で用量依存的に惹起された。一方, 標本外側 (内膜側) に ACh を投与すると, より低濃度 ($0.05 \mu\text{g}$) で血管径伸長反応が誘起された (図 9 上

段右)。しかし図 9 下段に示すように, この反転標本の内皮細胞をろ紙で擦過, 剝離した後, 同じ用量範囲の ACh を作用させても, 血管径伸長反応は誘起されなかった。逆に, 内腔あるいは外側より投与した高濃度 ($5 \sim 500 \mu\text{g}$) の ACh は $PGF_{2\alpha}$ の拘縮反応に重畳した収縮反応を誘起した。これらの結果を用量-反応曲線にまとめたものが図 10 である。この図の横軸は投与した ACh の量を μg 単位で表し, 縦軸は規準化した ACh の反応量を示す。すなわち上段で示す短縮量は基本外径 (D_0) に対するそれぞれの濃度の最大短縮量 ($4D_{\text{max}}$) の比で規準化し, 下段は 8×10^{-6} M $PGF_{2\alpha}$ の持続灌流で得られた最大短縮を 100% として各標本の伸長量を標準化した。図 10 下段に示すように, 正常標本, 反転標本それぞれの ACh 用量-反応曲線の ED_{50} 濃度は正常標本内腔投与 ($7.7 \pm 3.4 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, 外側投与 $24 \pm 11 \mu\text{g}$ ($n=9$), 反転標本内腔投与 $3.1 \pm 1.0 \mu\text{g}$, 外側投与 ($4.9 \pm 1.3 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ ($n=12$)) であった。正常ならびに反転標本の血管径伸長量の最大値はそれぞれ $92.3 \pm 3.6\%$, $84.3 \pm 3.5\%$ であった。しかし, 図 10 上段に示すように, 内皮細胞を擦過, 剝

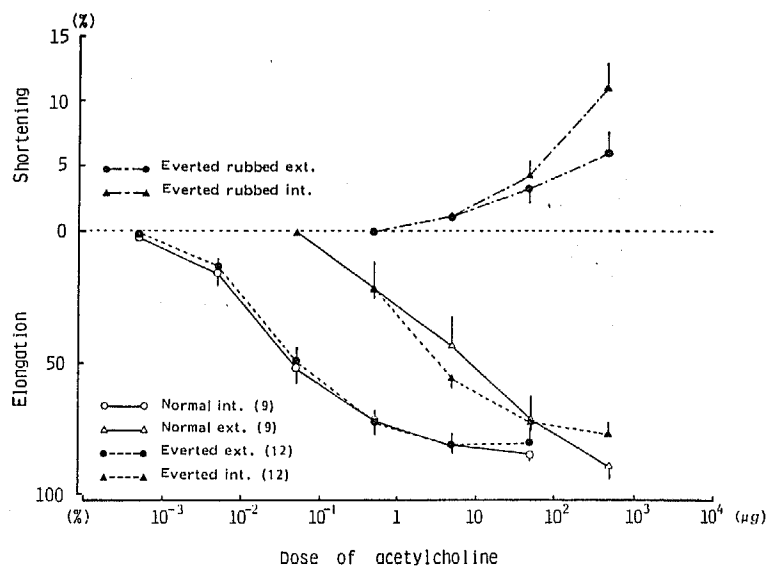


図10 正常標本 (実線) ならびに反転標本 [正常内皮群 (破線), 内皮剝離群 (一点鎖線)] における内腔・外側投与 ACh それぞれの用量-反応曲線 (括弧内の数字は実験例数を示す)

- Normal int. : 正常標本内腔投与群
- Normal ext. : 正常標本外側投与群
- Everted ext. : 反転標本外側投与群
- Everted int. : 反転標本内腔投与群
- Everted rubbed ext. : 反転内皮剝離標本外側投与群
- Everted rubbed int. : 反転内皮剝離標本内腔投与群

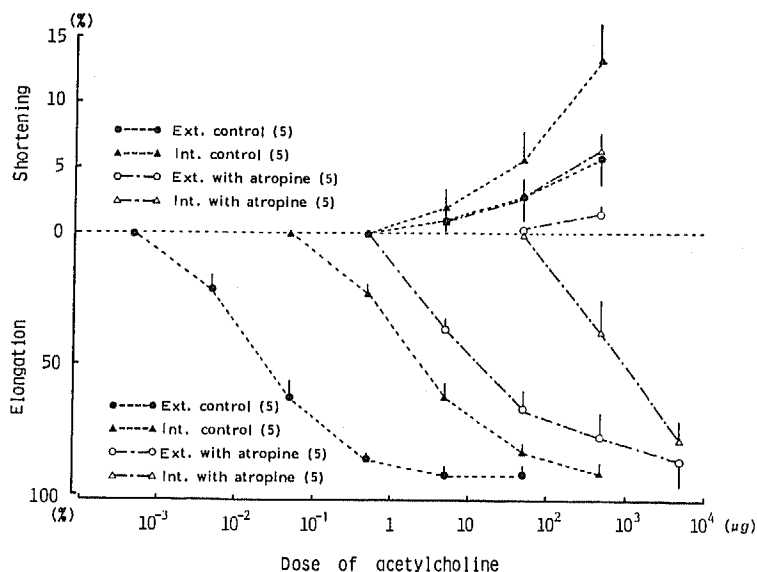


図11 正常内皮（下段）ならびに内皮剝離（上段）反転標本における内腔・外側投与 ACh それぞれの用量—反応曲線におよぼす atropine の影響（括弧内の数字は実験例数を示す）

Ext. control : 外側投与対照群
 Int. control : 内腔投与対照群
 Ext. with atropine : 外側投与 atropine 処理群
 Int. with atropine : 内腔投与 atropine 処理群

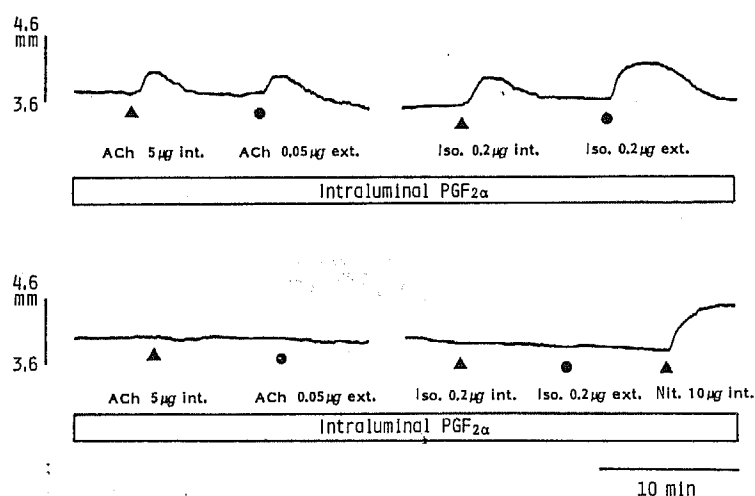


図12 正常内皮（上段）ならびに内皮剝離（下段）反転標本における内腔 (int.)・外側(ext.) ACh, Isoproterenol (Iso.), Sodium nitroprusside (Nit.) の血管径伸長反応の典型例 縦軸指標上端 (4.6mmφ) は PGF₂α 投与前の標本外径を示し, ▲●は薬物投与時点を示す

離した反転標本では、血管径伸長反応は完全に消失し、高濃度 ACh (5~500 μ g) による短縮反応のみが認められた。

反転標本で求めた ACh の用量-反応曲線に対する atropine (10^{-7} M) の影響を図11にまとめた。図の縦軸、横軸の指標はともに図10のそれらと同じである。Atropine の標本内腔、外側両処置により内腔すなわち外膜側に投与した ACh の用量-反応曲線は ED₅₀ 濃度の用量比で530 \pm 290倍、内膜側である標本外側投与では560 \pm 250倍右方へ平行移動した。一方、図11上段で示すように、1~10³ μ g の ACh によって誘起された短縮反応量は 10^{-7} M atropine の前処置により右下方に抑制された。

b Isoproterenol

図12に反転標本における β 受容体作用薬 isoproterenol (iso) の反応の典型例を示した。拘縮状態にある反転標本の内腔すなわち外膜側より 5 μ g, 続いて 0.05 μ g の ACh を内膜側にそれぞれ単一用量ずつ投与し、ほぼ35%の血管径伸長反応をまず確認した。標本安定後、標本内腔、外側にそれぞれ 0.2 μ g ずつの iso を単一用量ずつ投与すると ACh 同様、内膜側投与40%, 外膜側投与55%の血管径伸長反応が認められた。同じ反転標本の内膜側をろ紙で擦過、剝離し、上記と同じ用量の ACh, iso を標本内腔、外側にそれぞれ単一用量ずつ投与したが血管径伸長反応は完全に消失した(図12下段)。しかし、こうした条件下で反転標本の標本内腔に投与した 10 μ g の nitroprusside は顕

著な血管径伸長反応を誘起した。図13に iso の用量-反応曲線をまとめた。縦軸ならびに横軸の指標は図10, 11のそれらと同じである。図13下段に示すように、0.002~20 μ g の iso は用量依存的に血管径伸長反応を誘起した。正常標本における iso の ED₅₀ 濃度は標本内腔ならびに外側投与でそれぞれ 0.16 \pm 0.07 μ g, 2.0 \pm 0.8 μ g (n=8), 反転標本の場合にはそれぞれ 0.43 \pm 0.21 μ g, 0.31 \pm 0.08 μ g (n=5) であった。また、正常ならびに反転標本における最大血管径伸長反応量は 82.7 \pm 1.8%, 69.2 \pm 5.9% であった。内皮細胞を剝離した反転標本では標本外側に 2 μ g の iso を投与すると 7.0 \pm 4.0% (n=5) 程度の血管径伸長反応が誘起された。20 μ g 投与では反対に僅かではあるが血管径短縮反応が出現した (2.8 \pm 1.3%, n=5) (図13上段)。

c Sodium nitroprusside

図14上段は正常標本における nitroprusside (nit) の用量-反応曲線を、下段は反転標本における内皮細胞剝離前後の結果を用量-反応曲線を用いて示した。横軸は薬物投与量 (μ g) を対数目盛で表し、縦軸は規準化した血管径伸長量を示した。規準化の方法は図11, 13と同じである。nit (0.1~100 μ g) は正常ならびに反転標本いずれにも濃度依存的に血管径伸長反応を誘起した。正常標本の場合、内腔に投与した nit の用量-反応曲線の ED₅₀ 濃度 (1.6 \pm 0.8 μ g, n=4) は外側投与の ED₅₀ 濃度 (14.0 \pm 5.4 μ g) に比較して有意に低値 ($p<0.05$) を示した。一方、反転標本では内腔、

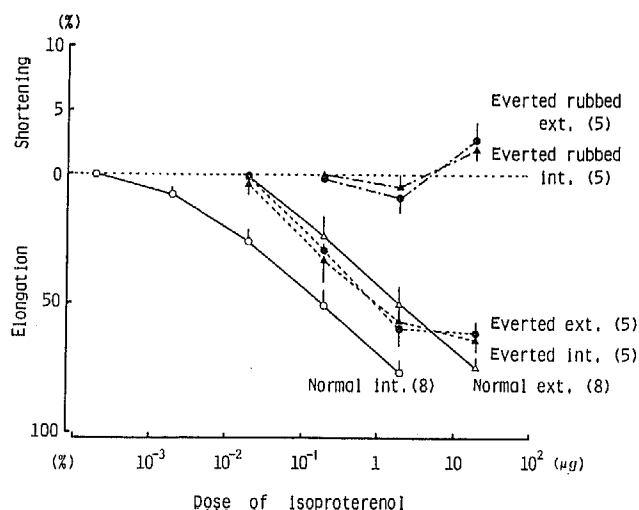


図13 正常標本(実線)ならびに反転標本[正常内皮群(破線), 内皮剝離群(一点鎖線)]における内腔・外側投与 isoproterenol それぞれの用量-反応曲線(括弧内の数字は実験例数を示す)

Normal int. : 正常標本内腔投与群
Normal ext. : 正常標本外側投与群
Everted ext. : 反転標本外側投与群
Everted int. : 反転標本内腔投与群
Everted rubbed ext. : 反転内皮剝離標本外側投与群
Everted rubbed int. : 反転内皮剝離標本内腔投与群

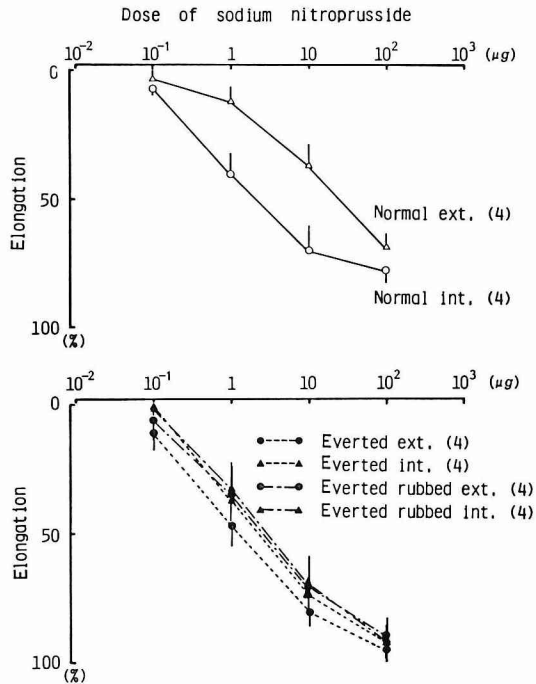
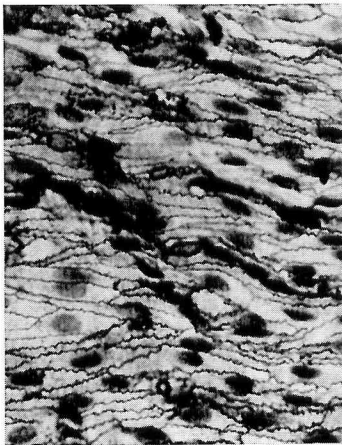
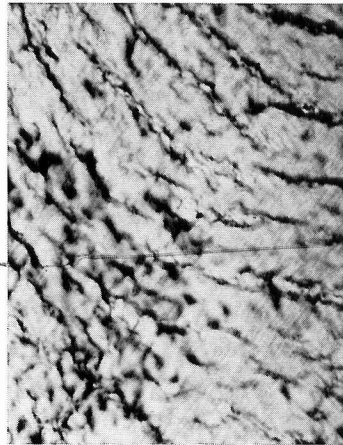


図14 正常標本(上段)ならびに反転標本(下段)
[正常内皮(破線), 内皮剥離(一点鎖線)]にお
ける内腔・外側投与 sodium nitroprusside
それぞれの用量-反応曲線(括弧内の数字は
実験例数を示す)



A



B

図15 正常内皮(A)ならびに内皮剥離(B)小皮標本の典型的な光顕像(×330)

外側両投与における ED_{50} 濃度の間に差異は認められなかった ($2.1 \pm 1.0 \mu g$: $1.2 \pm 0.3 \mu g$, $n=4$)。図14下段に示すように、反転標本の内皮細胞を剥離しても nit の血管径伸長反応には有意の変化を認めなかった (ED_{50} 濃度 対照標本内腔側 $1.2 \pm 0.3 \mu g$, 外腔側 $2.1 \pm 1.0 \mu g$: 内皮剥離標本内腔側 $4.3 \pm 3.1 \mu g$, 外腔側 $2.5 \pm 0.7 \mu g$: 最大血管径伸長反応量対照標本 $96.6 \pm$

5.4% : 内皮細胞剥離標本 $93.9 \pm 5.4\%$, $n=4$)。

B 形態学的検索

図15は反転処置を行わないイヌ腎動脈における正常 (A) ならびに内皮擦過, 剥離小皮標本 (B) の典型光顕像を示す。正常小皮標本ではほぼ同大の内皮細胞が一定方向に規則正しく配列し, それぞれの内皮細胞には楕円形の核が認められた。隣接内皮細胞の接合線

はほぼ明瞭であるが、一部に濃縮、顆粒状のものも存在した。一方、ろ紙で内膜面を擦過、剝離した小皮標本では、正常標本で認められたような敷石状の内皮細胞構造はほぼ完全に取り除かれ、内弾性板の走行に一致した波状の構造が表面に露出した。同様の形態学的検索を4頭のイヌ8例の腎動脈標本を用いて行い、全例でほぼ完全な内皮細胞剝離の所見が得られた。

反転処置を行ったイヌ腎動脈4例を用いて内皮細胞の付着状況を検索した。その結果、反転内皮正常小皮標本の内皮細胞は上で示した正常小皮標本と同じように、一定方向に規則正しく配列していることが全例で確認された。

IV 考 察

脈管系の内面はすべて単層の内皮細胞に覆われている。すなわち内皮細胞は血液と血管組織との境界をなす。以前は、内皮は均質様な細胞集団で血液凝固をおこさない脈管内腔の裏打ち層を形成し、その層は選択的透過性を示すと考えられていた。しかし、電顕的観察の進歩により、内皮細胞そのものの形態も内皮細胞間の接合方式も決して様なものではないことが明らかにされ、さらに内皮細胞質内に収縮蛋白より成るフィラメント構造が存在することも確かめられるに至った。また、内皮細胞培養技術の発達に伴って、内皮細胞には血液-血管組織関門としての機能以外に各種の代謝、合成機能のあることがわかってきた¹⁷⁾。たとえば、内皮細胞における angiotensin 変換酵素の存在¹⁸⁾ や各種 prostaglandins の合成¹⁹⁾ や不活化がこれにあたる。

1980年に至ると血管内皮細胞に血管平滑筋の緊張を制御する内因性物質の存在することが示唆されるに至った。すなわち、Furchgott と Zawadzki¹⁾ は内皮細胞を剝離したウサギ大動脈円周方向標本と内皮細胞の存在している縦方向標本を貼りあわせたサンドイッチ標本を用いて ACh の弛緩反応が内皮細胞依存性であり、しかもある化学伝達物質を介してこの弛緩反応が引き起こされていることを実験的に証明した。さらに最近、ラット大動脈⁹⁾⁻¹¹⁾あるいはウサギ冠動脈標本¹²⁾で、血管弛緩物質ばかりでなく norepinephrine あるいは 5-hydroxytryptamine による収縮反応が内皮細胞剝離により増強され、生理的状态で内皮細胞がこれら血管作動物質の収縮作用を制御している可能性も示唆されてきた。

本稿では摘出したイヌ腎動脈の正常ならびに反転標

本を用い、内腔と外側を別々に灌流する実験系を作製し、各種生理活性物質に対する反応性とその反応性に対する内皮細胞の役割を検索した。図15に示すようにろ紙を用いた内皮細胞の機械的剝離方法はほぼ完全に内皮細胞を取り除くことができ、しかも、われわれの使用した反転処置は内皮細胞を剝離せず実験目的に十分叶うことを形態学的に証明した。

A 血管収縮反応におよぼす内皮細胞の役割

Bevan と Duckles²⁰⁾ はガラス球表面に結合した NE をウサギ大動脈条片の内膜面のみに作用させる実験を行った。その結果、彼らは内皮細胞にも α 受容体が存在し、この受容体刺激によって内皮細胞から平滑筋細胞へ何らかの情報伝達が行われている可能性を示唆した。また、ラット大動脈らせん条片に⁹⁾⁻¹¹⁾における NE, phenylephrine, angiotensin I, II, clonidine, ウサギ冠動脈らせん条片¹²⁾における histamine, 5-HT, phenylephrine の収縮反応は内皮細胞剝離によって増強されることが実験的に示された。一方、ウサギ大動脈¹⁾あるいはイヌ大腿動脈輪状標本²⁾において NE の血管収縮反応は内皮細胞を剝離してもほとんど影響を受けないと報告されている。

今回のわれわれの実験結果は、反転標本の内皮細胞を擦過、剝離後、内膜側あるいは外膜側から NE を投与しても、その反応性は対照群と変わりなかった。5-HT, PGF₂ α の短縮反応も内皮細胞剝離によって影響を受けなかった。以上のような実験結果の違いは用いた血管の種差や部位差に基づくものと考えられるが血管収縮物質の反応性に対する内皮細胞の役割については今後尚一層、慎重な解析が必要と思われる。

われわれの使用した実験系においては、反転標本における血管短縮反応の最大短縮量は、使用した収縮物質の種類や投与経路のいかんによらず、正常標本よりも有意に大きかった。その理由の1つとして反転標本の場合、血管短縮に寄与する血管平滑筋の基本長が反転によって伸展されたため、平滑筋細胞の長さ-張力関係が変化したことが考えられる。しかし、反転処置を行っても、内圧 80mm Hg 負荷時の標本外径(正常標本 4.29 \pm 0.15mm, 反転時 4.09 \pm 0.17mm (n=8))は対照の血管外径とほとんど変わらないことが確認された。故に、反転処置によって平滑筋細胞の長さ-張力関係が著しく変化しているとは考えられず、この要因が最大短縮量増加の主因とはなり得ないと思われる。

次に、内皮細胞に隣接した中膜内側の平滑筋群と中

膜外側の平滑筋群の薬物感受性の違いがその要因になり得ることが予想される。事実、いくつかの動脈標本ではこのような差異が知られている²¹⁾。Graham と Keatinge²²⁾ はヒツジ頸動脈標本の内膜側あるいは外膜側の平滑筋を別々に特殊な熱処理方法で不活化し、NE の反応性を検討し、内膜側の平滑筋群が高い NE 感受性を示すことを報告している。電気生理学的にもヒツジ頸動脈中膜の内膜側と外膜側平滑筋群との間には平滑筋細胞膜の静的ならびに動的な電気膜特性に違いが存在する (Mekata と Keatinge 1975, Mekata 1984)²³⁾²⁴⁾。イヌ腎動脈にもこのような差異があるとすれば反転標本の外側すなわち内膜側投与による高い血管径短縮反応を説明する一因になると思われる。しかし、これだけでは反転標本内腔投与時の高反応性を説明することはむずかしい。

一般に血管壁のメカニクス特性や壁構造の異方性から、壁内平滑筋の収縮に基づく血管口径の変化は外径に比べて内径の方が大きいことが知られている¹³⁾。これら動脈壁のレオロジー特性と壁構造の不均一性が互に関連して、反転標本における血管収縮物質の標本内腔投与に認められた高い反応性を引き起こしているものと思われる。これらの実験的証明は今後の検討を待たねばならない。

正常ならびに反転標本いずれにおいても内膜側より投与した NE あるいは EP は外膜側投与に比較してより鋭敏な反応性を示した。すなわち内膜側投与の用量-反応曲線は外膜側投与のそれに比べ左方に移動した。この感受性の増大は最大反応量を 100% として実験データを整理し直してみても残存し、統計処理の問題ではないことを確認した。また、この高感受性は反転標本の外側投与時、すなわち灌流圧がきわめて低い標本外側よりカテコラミンを投与した状態でも認められた。こうした事実より、この感受性の差異を生じる要因に保生液の灌流圧の違いはほとんど影響していないものと思われる。

次に血管外膜側に存在する交感神経終末部²⁵⁾²⁶⁾や神経外組織²⁷⁾における NE、EP の取り込み機構の関与が考えられる。しかし、図 5 で示すようにイヌ腎動脈標本の NE、EP 反応はカテコラミンの uptake₁, uptake₂ 機構を 20~30% 抑制すると言われる濃度²⁸⁾の cocaine (10^{-7} M), hydrocortisone (10^{-6} M) 処置を施してもまったく影響を受けなかった。ゆえに本標本ではこうした NE の取り込み機構が感受性の差異を生ずる要因の主因とはなっていないことが判る。

感受性の差異を生じる要因として血管壁内におけるカテコラミン拡散の部位差、すなわちその部位差を生ずる要因として、血管壁構造物による拡散係数の差異と血管壁構造の不均一性、カテコラミン分解酵素壁内分布の不均一性、内皮細胞のカテコラミン拡散の促進性などが重要な役割を果たしているのかもしれない。しかし、感受性差異の発生とこれらカテコラミン拡散の不均一性との関係については今後の検討が必要である。

イヌ腎動脈平滑筋細胞におけるカテコラミン α 受容体の特性を薬理学的に解析した。 α_1 の選択性遮断剤 prazosin を用いて Schild の解析¹⁵⁾を行うと、 pA_2 はほぼ 8.2 であった。Corynanthine と NE を用いた Sakakibara ら²⁹⁾ (1982) のイヌ腎動脈標本の実験結果 (8.50 ± 0.11) とほぼ一致した。一方、 α_2 選択性遮断剤 yohimbine (10^{-8} M~ 10^{-7} M) も NE の用量-反応曲線を多少右方へ移動させたが、その程度は用量比にして 3.6 倍 (10^{-7} M) ほどであり、prazosin に比較して有意に少なかった。こうした実験事実はイヌ腎動脈平滑筋細胞のカテコラミン α 受容体は主として α_1 受容体であることを示唆している。

B 血管弛緩反応におよぼす内皮細胞の役割

1 Acetylcholine

われわれの実験事実は内膜側に投与した ACh のみならず外膜側に投与した ACh も、Furchgott と Zawadzki¹⁾ が指摘したように内皮細胞に作用し何らかの機序で血管径伸長反応を引き起こしていることを示唆している。すなわち外膜側より作用させた ACh も中膜にある平滑筋層を通過して内皮細胞に到達し、ある化学伝達物質の分泌を介して血管平滑筋の弛緩反応を誘起している可能性がある。一方、Cohen ら³⁰⁾ はイヌ冠動脈の円筒状標本を用いて、内膜側に投与した 10^{-6} M ACh は血管平滑筋の弛緩反応を誘起したが、外膜側に投与した同濃度の ACh は弛緩反応を惹起し得なかったと報告している。このような差異が生じたのはおそらく使用動脈標本の違いと使用した ACh の濃度差に関係しているものと思われる。

内膜あるいは外膜側より投与した ACh の用量-反応曲線はその感受性が著しく異なる (図 10)。この差異を生ずる一因として血管壁内に分布する choline esterase の存在が重要な意味を持つことが判明した。すなわち、抗 choline esterase である physostigmine 10^{-6} M を含んだ保生液を標本内腔、外側両方から灌流した条件下で ACh の血管径伸長反応を観察すると、

内膜側に投与した ACh の反応性はほとんど変化しなかったが外膜側より投与した ACh の用量-反応曲線は左方に移動し、反応性が増強した。しかし、内膜側投与の ACh 反応曲線と完全に一致するまでには至らなかった（未発表所見）。この事実は外膜側から投与された ACh が血管壁を通過する間に壁内に存在している choline esterase によって分解され、それが外膜側より投与された ACh の低反応性を説明する一因となり得ることを示唆する³¹⁾³²⁾。標本内腔、外側両方に atropine 10^{-7} M の前処置をするとそれぞれの用量-反応曲線は右方へ約 500 倍平行移動した。この事実は内膜側あるいは外膜側より投与された ACh による血管径伸長反応は内皮細胞の muscarine 受容体を介して生じていることを意味する。

2 Isoproterenol

Isoproterenol を用いたわれわれの実験事実は、iso には内皮細胞を介する弛緩反応と平滑筋細胞に直接作用して発現する弛緩反応が共存している可能性を示唆する。しかし、従来の報告では iso の弛緩反応は内皮細胞に依存していないとされてきた。Chand と Altura³⁾ は内皮細胞を擦過、剝離したイヌ腎動脈のらせん条片標本において、 4×10^{-7} M の iso は血管平滑筋の弛緩反応を引き起こすと報告している。すなわち、彼らの実験では、使用した iso の濃度がわれわれ

の使用濃度より高く、平滑筋に対する iso の直接的な弛緩反応がみられる領域で実験を行っていた可能性がある。他の血管標本において β 受容体を介する弛緩反応に内皮細胞依存成分が存在するか否かの検討は今後の詳細な実験が必要である。

3 Sodium nitroprusside

Nitroprusside に関する実験事実は nit が血管平滑筋細胞膜に直接作用して弛緩反応を誘起していることを示唆している。これらの結果はラット大動脈標本を用いた Rapoport と Murad³³⁾ の実験結果とよく一致する。

稿を終るに臨み、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師大橋俊夫教授ならびに東 健彦信州大学名誉教授に深く感謝の意を表しますとともに、御助言御協力いただきました坂口正雄助教授（長野高専・電気科）ならびに教室諸兄に御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第60回日本生理学会総会（昭和59年3月）、第26回日本平滑筋学会総会（昭和59年7月）、第25回日本脈管学会総会（昭和59年10月）、第61回日本生理学会総会（昭和60年3月）、第27回日本平滑筋学会総会（昭和60年6月）において発表した。

文 献

- 1) Furchgott, R.F. and Zawadzki, J.V. : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* (London), 288 : 373-376, 1980
- 2) De Mey, J.G. and Vanhoutte, P.M. : Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*, 316 : 347-355, 1981
- 3) Chand, N. and Altura, B.M. : Inhibition of endothelial cell-dependent relaxations to acetylcholine and bradykinin by lipoxygenase inhibitors in canine isolated renal arteries. *Microcirculation*, 1 : 211-223, 1981
- 4) De Mey, J.G., Claeys, M. and Vanhoutte, P.M. : Endothelium-dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine triphosphate, thrombin and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 222 : 166-173, 1982
- 5) De Mey, J.G. and Vanhoutte, P.M. : Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ Res*, 51 : 439-447, 1982
- 6) Frank, G.W. and Bevan, J.A. : Electrical stimulation causes endothelium-dependent relaxation in lung vessels. *Am J Physiol*, 244 : H793-H798, 1983
- 7) Furchgott, R.F. : Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res*, 53 : 557-573, 1983
- 8) Katusic, Z.S., Shepherd, J.T. and Vanhoutte, P.M. : Vasopressin causes endothelium-dependent relaxations of the canine basilar artery. *Circ Res*, 55 : 575-579, 1984
- 9) Allan, G., Brook, C.D., Cambridge, D. and Hladkiwskyj, J. : Enhanced responsiveness of vascular smooth muscle to vasoconstrictor agents after removal of endothelial cells. *Br J*

- Pharmacol, 79 : 334P, 1983
- 10) Eglème, C., Godfraind, T. and Miller, R.C. : Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 81 : 16-18, 1984
 - 11) Miller, R.C., Mony, M., Schini, V., Schoeffter, P. and Stoclet, J.C. : Endothelial mediated inhibition of contraction and increase in cGMP levels evoked by α -adrenoceptor agonist B-H T920 in rat isolated aorta. *Br J Pharmacol*, 83 : 903-908, 1984
 - 12) Griffith, T.M., Henderson, A.H., Hughes Edwards, D. and Lewis, M. J. : Isolated perfused rabbit coronary artery and aortic strip preparations : The role of endothelium-derived relaxant factor. *J Physiol*, 351 : 13-24, 1984
 - 13) 坂口正雄 : 血管弛緩の発現機序. *信州医誌*, 27 : 204-215, 1979
 - 14) Sakaguchi, M., Ohhashi, T. and Azuma, T. : A photoelectric diameter gauge utilizing the image sensor. *Pflügers Arch*, 378 : 263-268, 1979
 - 15) Arunlakshana, O. and Schild, H.O. : Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol*, 14 : 48-58, 1959
 - 16) Poole, J.C.F., Sanders, A.G. and Florey, H.W. : The regeneration of aortic endothelium. *J Path Bact*, 75 : 133-143, 1958
 - 17) 東 健彦 : 内皮の構造と機能をめぐって. *生体の科学*, 36 : 170-172, 1985
 - 18) Ryan, U.S., Ryan, J.W., Whitaker, C. and Chiu, A. : Localization of angiotensin converting enzyme (kininase II). II. Immunocytochemistry and immunofluorescence. *Tissue Cell*, 8 : 125-145, 1976
 - 19) Moncada, S., Herman, A.G., Higgs, E.A., and Vane, J.R. : Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*, 11 : 323-344, 1977
 - 20) Bevan, J.A. and Duckles, S.P. : Evidence for α -adrenergic receptors on intimal endothelium. *Blood Vessels*, 12 : 307-310, 1975
 - 21) Keatinge, W.R. and Torrie, C. : Action of sympathetic nerves on inner and outer muscle of sheep carotid artery and effect of pressure on nerve distribution. *J Physiol*, 257 : 699-712, 1976
 - 22) Graham, J.M. and Keatinge, W.R. : Differences in sensitivity to vasoconstrictor drugs within the wall of the sheep carotid artery. *J Physiol*, 221 : 477-492, 1972
 - 23) Mekata, F. and Keatinge, W.R. : Electrical behavior of inner and outer smooth muscle of sheep carotid artery. *Nature (London)*, 258 : 534-535, 1975
 - 24) Mekata, F. : Different electrical responses of outer and inner muscle of rabbit carotid artery to noradrenaline and nerves. *J Physiol*, 346 : 589-598, 1984
 - 25) de la Lande I.S., Frewin, D. and Waterson, J.G. : The influence of sympathetic innervation on vascular sensitivity to noradrenaline. *Br J Pharmacol Chemother*, 31 : 82-93, 1967
 - 26) Pascual, R. and Bevan, J.A. : Variation in contractile response characteristics of rabbit aorta strips with surface of drug entry. *J Pharmacol Exp Ther*, 210 : 51-55, 1979
 - 27) Pascual, R. and Bevan, J.A. : Asymmetry of consequences of drug disposition mechanisms in the wall of the rabbit aorta. *Circ Res*, 46 : 22-28, 1980
 - 28) Iversen, L.L. : The uptake of noradrenaline by the isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol*, 21 : 523-537, 1963
 - 29) Sakakibara, Y., Fujiwara, M. and Muramatsu, I. : Pharmacological characterization of the alpha adrenoceptors of the dog basilar artery. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*, 319 : 1-7, 1982
 - 30) Cohen, R.A., Shepherd, J.T. and Vanhoutte, P.M. : Endothelium and asymmetrical responses of the coronary arterial wall. *Am J Physiol*, 247 : H403-H408, 1984
 - 31) Bevan, J.A., Buga, G.M., Florence, V.M., Gonsalves, A. and Snowden, A. : Distribution

- of choline acetyltransferase in cerebral and extracerebral cranial arteries of the cat. Its relationship to neurogenic atropine-sensitive dilation. *Circ Res*, 50 : 470-476, 1982
- 32) Lee, T.J.-F. : Cholinergic mechanism in the large cat cerebral artery. *Circ Res*, 50 : 870-879, 1982
- 33) Rapoport, R.M. and Murad, F. : Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res*, 52 : 352-357, 1983

(60. 8. 13 受稿)
