

# Two-kidney, one-clip 腎血管性高血圧ラットにおける血管内皮機能障害に及ぼす外因性一酸化窒素の影響

大塚雄司 原澤信介 杉浦 仁 小池美由紀  
秋元秀郎 石井利明 阿部田ひろみ 岡部 龍也  
久代登志男 上松瀬勝男

The effect of exogenous nitric oxide on endothelial dysfunction in two-kidney, one-clip renovascular hypertensive rats

Yuji OTSUKA, Shinsuke HARASAWA, Hitoshi SUGIURA, Miyuki KOIKE,  
Hideo AKIMOTO, Toshiaki ISHII, Hiromi ABETA, Tatsuya OKABE, Toshio KUSHIRO,  
and Katsuo KANMATSUSE

Department of Cardiology, Surugadai Nihon University Hospital, Tokyo, Japan

Previous studies have shown that hypertension causes endothelial dysfunction. To study the influence of exogenous nitric oxide (NO) on endothelial dysfunction produced by hypertension, we administered a non-depressor dose of nipradilol to two-kidney, one-clip renovascular hypertensive rats (2K1C). Sprague-Dawley rats underwent either sham surgery (G-1) or clipping of the left renal artery. From day seven, 2K1C were randomized into 3 groups, placebo treatment (G-2), nipradilol treatment (G-3), and propranolol treatment (G-4). Urinary  $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$  ( $\text{NO}_x$ ) excretion ( $\text{UNO}_x\text{V}$ ) was measured 4 weeks after clipping, and then, acetylcholine (Ach), A23187, or sodium nitroprusside (SNP)-induced relaxation were measured in the aorta. Blood pressure was increased in G-2, G-3, and G-4 compared to G-1.  $\text{UNO}_x\text{V}$  was lower in G-2, G-3, and G-4 compared to G-1, but  $\text{UNO}_x\text{V}$  was higher in G-3 compared to G-2 and G-4. Although Ach or A23187-induced relaxation was significantly decreased in isolated artery from G-2, G-3, and G-4 compared with those from G-1. Ach- or A23187-induced relaxation was improved in G-3. SNP-induced relaxation did not differ among the 4 groups.

These results suggest that exogenous NO from nipradilol reduces the endothelial dysfunction caused by hypertension without changing the blood pressure.

Jpn J Nephrol 2000 ; 42 : 619-624.

**Key words** : nipradilol, acetylcholine, A23187

## はじめに

血管内皮細胞は、一酸化窒素(NO)、エンドセリン、プロスタサイクリンなどを産生し、様々な生理機能の調節をしている。NOはL-arginineを基質としてNO合成酵素により産生され遊離する。内皮細胞で産生したNOは拡散により平滑筋細胞に達し、soluble guanylate cyclaseを

活性化し、cyclic GMPが増加することによって血管弛緩が生じる<sup>1)</sup>。このようにNOは血管の緊張を調節し、高血圧によってこの内皮依存性血管弛緩が減弱することが報告されている<sup>2,3)</sup>。また、この高血圧による内皮機能障害は、高血圧を改善すると正常化することも知られている<sup>2,3)</sup>。高血圧による内皮機能障害は高血圧を進展させ、臓器障害の原因となる可能性が考えられている。さらに、

高血圧以外にも動脈硬化や糖尿病などでも血管内皮細胞が障害を受けることが知られている。

2-kidney, 1-clip 腎血管性高血圧ラット (2K1C) や deoxycorticosterone acetate (DOCA) 食塩高血圧ラットなどの実験的高血圧モデルでは、血圧の上昇に伴って NO の産生が増加するが、高血圧が持続すると NO の産生が低下することが報告されている<sup>4-6)</sup>。ヒトにおいても高血圧によって内皮細胞が障害され、内皮細胞からの NO の遊離が減少している可能性が報告されている<sup>7)</sup>。

NO 合成酵素阻害剤をヒトやラットに投与すると血圧が上昇することから<sup>8,9)</sup>、実験的高血圧モデルに外因性に NO を投与すれば、内皮機能障害や血圧の上昇が改善する可能性が考えられる。しかし、高血圧による内皮機能障害は血圧の低下によって改善することから、外因性の NO による高血圧内皮機能障害への影響を検討するためには、血圧に影響のない量を投与する必要がある。今回、われわれは NO 供与体である nipradilol<sup>10)</sup> の非降圧用量を実験的高血圧モデルである 2K1C に投与し、血管内皮機能障害について検討した。

## 方 法

体重 190~200 g の雄性の Sprague-Dawley ラット 26 匹を実験に用いた。エーテル麻酔下で左腎動脈に間隙 0.23 mm の銀製クリップを装着し、1 週間後、Rat Tail Manometer-Tachometer System (KN-210; 夏目製作所, 東京) によって収縮期血圧を測定し、収縮期血圧が 160 mmHg 以上のラットを以下の 3 群に分け 3 週間飼育した。nipradilol (興和, 名古屋) を含有した蒸留水を与えたラットを NIP 群 (n=7), propranolol (Sigma, St. Louis, USA) を含有した蒸留水を与えたラットを PRO 群 (n=6), そして飲水として蒸留水を与えたラットを CONT 群 (n=7) とした。nipradilol と propranolol の含有量は、最初の 1 週間は 100 mg/l, 次の 1 週間は 150 mg/l, その後は 200 mg/l とした。偽手術を行い、飲水として蒸留水を与えたラットを SHAM 群とした (n=6)。ラットは室温 25°C の条件下に自由摂食、自由飲水とした。

### 実験 1

ラットの体重と収縮期血圧を毎週測定し、実験終了前日に代謝ケージを用い 24 時間尿を採取し、NO の代謝産物である NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> (NO<sub>x</sub>) 排泄量 (UNO<sub>x</sub>V) を測定した。尿中 NO<sub>x</sub> の測定は autoanalyser (TCL-NOX1000; 東京化成

工業, 東京) を用い Green らの方法で測定した<sup>11)</sup>。

### 実験 2

実験 1 終了後、ラットは体重と収縮期血圧を測定して実験 2 に供した。ラットの胸部大動脈を摘出し、顕微鏡下で内皮細胞を温存した螺旋状条片を作製した。37°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 通気下の physiological salt solution [組成 (mM/l): NaCl 130; KCl 4.7; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.17; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.6; NaHCO<sub>3</sub> 14.9; dextrose 5.5; CaNa ethylenediaminetetraacetic acid 0.03] を満たした organ bath に L 字型フックを用いて螺旋状条片を装着し、force displacement transducer (UL-10GR; 日本電気三栄, 東京) を用い、等尺性に張力の変化をレクチホリー (8K51; 日本電気三栄, 東京) に記録した。

螺旋状条片は 1,500 mg の負荷にて 1 時間安定後、phenylephrine (PE; 10<sup>-5</sup>M; Sigma) を用い最大収縮を求めた。血管弛緩は前収縮に依存するため、PE を用い PE の最大収縮の 60% で収縮された状態で、acetylcholine (Ach; 10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup>M; Sigma), sodium nitroprusside (SNP; 10<sup>-10</sup>~10<sup>-7</sup>M; Sigma) あるいは Ca イオノフォアの A23187 (10<sup>-9</sup>~10<sup>-6</sup>M; Calbiochem, California, USA) を累積投与し、血管弛緩反応を測定した。Ach, SNP, A23187 による血管弛緩は、PE による収縮後の弛緩反応で評価し、Ach, SNP, A23187 投与前の PE による発生張力に対する%で表した。

結果は mean ± SEM で表した。有意差の検討は Mann-Whitney's U test を用い、危険率が 5% 未満を統計学的有意差とした。

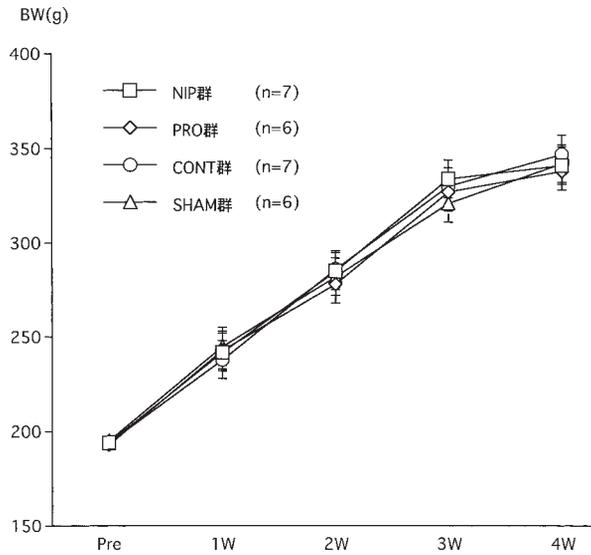
## 結 果

各ラットの体重は Fig. 1 に示した。体重は各群間で差を認めなかった。

各ラットの収縮期血圧を Fig. 2 に示した。収縮期血圧は、クリップ装着 1 週間より SHAM 群に比較して他の 3 群は有意 (p<0.01) に上昇したが、3 群間では差を認めなかった。

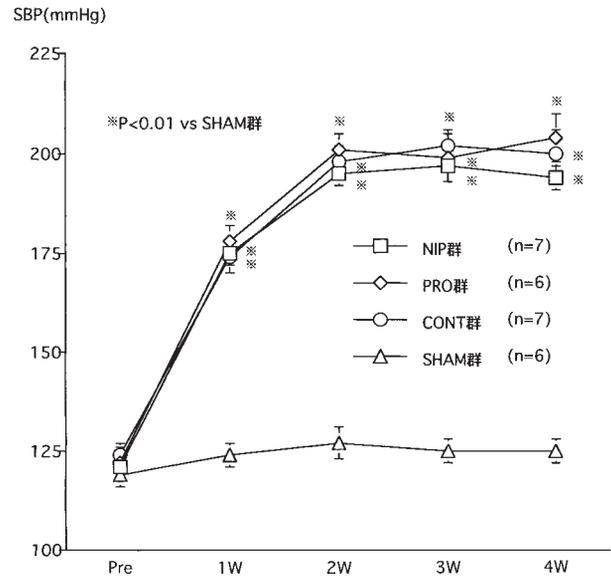
各ラットのクリップ装着 4 週後の心拍数は、SHAM 群に比較して CONT 群は有意 (p<0.05) に増加したが (352 ± 6 vs 415 ± 9 bpm), NIP 群と PRO 群は有意 (p<0.05) に減少した (298 ± 9 vs 305 ± 8 bpm)。

各ラットの飼料摂取量は、NIP 群 19.5 ± 0.5 g/day, PRO 群 18.8 ± 0.7 g/day, CONT 群 18.1 ± 0.7 g/day,



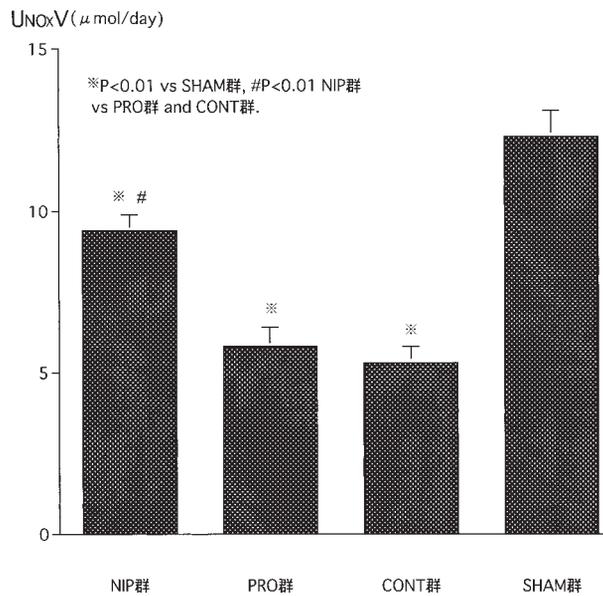
**Fig. 1. Body weight (BW) in the NIP, PRO, CONT, and SHAM**

Values are expressed as mean ± SEM.



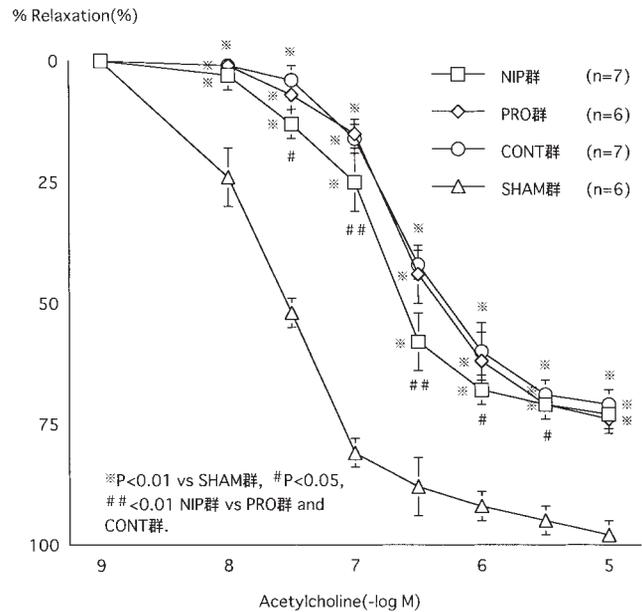
**Fig. 2. Systolic blood pressure (SBP) in the NIP, PRO, CONT, and SHAM**

Values are expressed as mean ± SEM.



**Fig. 3. Urinary NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NO<sub>x</sub>) excretion (UNO<sub>x</sub>V) in NIP, PRO, CONT, and SHAM**

Values are expressed as mean ± SEM.



**Fig. 4. Relaxation responses to acetylcholine in the thoracic aorta of NIP, PRO, CONT, and SHAM**

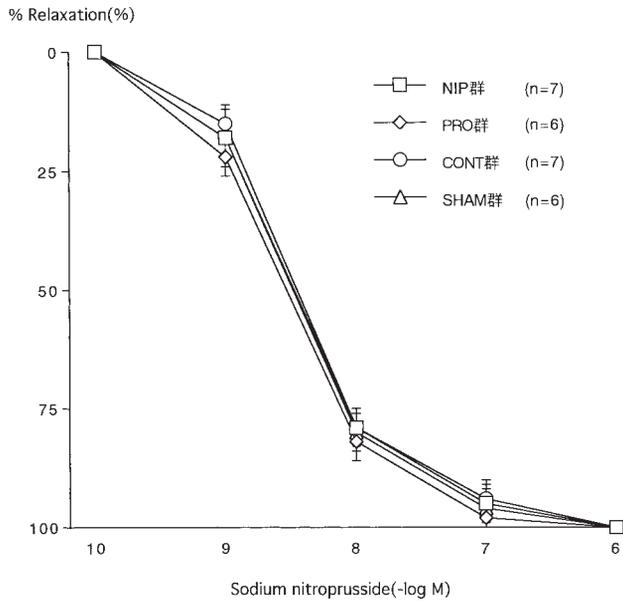
Values are expressed as mean ± SEM.

SHAM 群 20.3 ± 0.8 g/day であり、4 群間で差を認めなかった。

各ラットの UNO<sub>x</sub>V を Fig. 3 に示した。NIP 群の UNO<sub>x</sub>V は SHAM 群に比較して有意に低値であったが (9.4 ± 0.5 vs 12.3 ± 0.8 μmol/day, p < 0.01), PRO 群と CONT 群 (5.8 ± 0.6 vs 5.3 ± 0.5 μmol/day) より有意 (p < 0.01) に高値であった。

Ach による血管弛緩反応を Fig. 4 に示した。NIP 群、PRO 群、CONT 群の胸部大動脈標本に対する Ach による血管弛緩反応は、SHAM 群に比較して有意に低下していた。PRO 群と CONT 群間の Ach による血管弛緩反応は差を認めなかったが、NIP 群に比較して PRO 群と CONT 群の Ach による血管弛緩反応は有意に低下していた。

SNP による血管弛緩反応は 4 群間で差を認めなかった



**Fig. 5. Relaxation responses to sodium nitroprusside in the thoracic aorta of NIP, PRO, CONT, and SHAM**

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

(Fig. 5)。

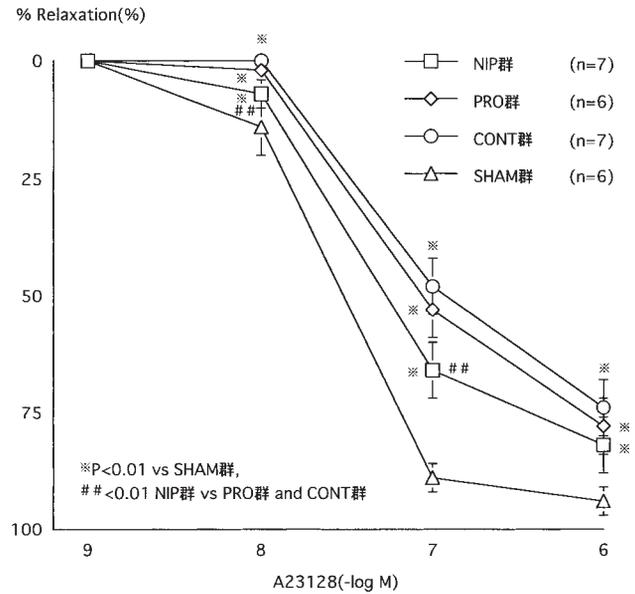
A23187による血管弛緩反応をFig. 6に示した。NIP群、PRO群、CONT群の胸部大動脈標本に対するA23187による血管弛緩反応は、SHAM群に比較して有意に低下していた。PRO群とCONT群間のA23187による血管弛緩反応は差を認めなかったが、 $10^{-8}$ ~ $10^{-7}$ MのA23187に対する血管弛緩反応は、NIP群に比較してPRO群とCONT群は有意に低下していた。

## 考 察

本研究では2K1Cを用い、高血圧性血管内皮機能障害に対する外因性NOの影響について検討した。今回の研究の結果、2K1Cの $UNO_xV$ は減少し、内皮依存性血管弛緩は低下したが、2K1Cに非降圧用量のnirpradilolを投与することによって $UNO_xV$ は増加し、内皮依存性血管弛緩が改善したことから、そして2K1Cに非降圧用量のpropranololを投与したが $UNO_xV$ と内皮依存性血管弛緩には影響を及ぼさなかったことが示された。

体内で産生されたNOは非常に不安定で、酸素、ヘモグロビン、スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )などと反応して安定な代謝産物である $NO_x$ に代謝される<sup>12)</sup>。

血管内皮細胞において、NOは血流によるズリ応力により常時放出され、血圧の調節因子として作用することが明



**Fig. 6. Relaxation responses to A23128 in the thoracic aorta of NIP, PRO, CONT, and SHAM**

Values are expressed as mean  $\pm$  SEM.

らかにされている<sup>13)</sup>。尿中の $NO_x$ は体内で産生されたNO以外に、飼料に由来するものも含まれているが<sup>14)</sup>、本研究では $UNO_xV$ 測定時、各ラット間で飼料摂取量に差がなかったことから、 $UNO_xV$ をラット間で比較することは、体内で産生されたNOを比較することを意味している。

今回の検討では、2K1Cにおいてクリップ装着4週後、 $UNO_xV$ がSHAM群に比べて減少したことから、2K1CではNOの産生が低下していることが考えられる。2K1Cの $UNO_xV$ の低下は、propranololの投与では影響がなかったがnirpradilolの投与によって増加した。

生体内でのNOの産生量を反映するものには、尿中や血中の $NO_x$ とcyclic GMPがあるが、cyclic GMPは心房性利尿ペプチド(ANP)によっても産生され、しかも2K1CではANPが増加すると報告されていることから<sup>5,15)</sup>、cyclic GMPに比較して $NO_x$ が生体内でのNOの産生量をよりよく反映するものと考えられる。しかし、本態性高血圧患者や実験的高血圧モデルにおいて尿中や血中の $NO_x$ を検討した報告は少ない。Surdackiらは本態性高血圧患者を対象に尿中の $NO_x$ 排泄量を検討した結果、血圧が正常な対照に比べて減少していたと報告し<sup>7)</sup>、横小路ら<sup>5)</sup>は、クリップ装着4週後の2K1Cの $UNO_xV$ が減少していたと報告している。これらは、今回の結果と一致するが、Dubeyら<sup>16)</sup>は、one-kidney, one-clip腎血管性高血圧ラットの血中 $NO_x$ 濃度を検討し、クリップ装着2週後の

血中 NO<sub>x</sub>濃度は増加するが、クリップ装着5週後は減少し元に復したと報告している。Dubey らの結果と今回の結果の相違が、実験モデルの相違によるものか、尿中と血中の相違によるものなのかは明らかではない。

本研究の検討では、2K1C においてクリップ装着4週後、Ach あるいは A23187 による内皮依存性血管弛緩が減弱したのは、SNP による内皮非依存性血管弛緩が対照と差がなかったことより、血管平滑筋の NO 反応性の低下ではなく、血管内皮細胞における NO の産生が減少したことによると考えられる。この NO 産生減少は高血圧による内皮の障害によるものと考えられる。これは、DOCA 食塩高血圧ラットや one-kidney, one-clip 腎血管性高血圧ラットなどの摘出血管を用いた検討の結果、内皮依存性血管弛緩が減弱していることや組織 cyclic GMP が減少していることと一致する<sup>3,5,17)</sup>。

高血圧による内皮機能障害は、血圧を低下させることによって改善することが種々の実験的高血圧モデルで示されている<sup>2,3)</sup>。そこで、今回の検討では血圧に影響を及ぼさない量の propranolol と nipradilol を用いた。nipradilol は ONO<sub>2</sub>基を有するため NO 供与体となりうる β 遮断薬である。今回の結果は NO の産生を介したものと考えられるが、β 遮断作用による可能性も否定できない。そこで、β 遮断薬で NO 放出作用のない propranolol と nipradilol の作用を比較検討した。2K1C において nipradilol により UNO<sub>x</sub>V は増加し、内皮依存性血管弛緩が改善したが、propranolol により UNO<sub>x</sub>V と内皮依存性血管弛緩が改善しなかったことから、nipradilol の効果は β 遮断作用ではなく、nipradilol の持つ ONO<sub>2</sub>基による NO 供与が高血圧による内皮機能障害抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

外因性の NO がどのような機序で高血圧によって障害された血管内皮機能を改善するのか明らかではない。血管壁の O<sub>2</sub>が、高血圧による血管内皮機能障害に関与していることが考えられている。O<sub>2</sub>は NO を消去し、パーオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) を形成する。O<sub>2</sub>によるスカベンジ作用によって NO の生理活性が低下し、さらに産生された ONOO<sup>-</sup>によって細胞は障害される。レニン・アンジオテンシン系が亢進している高血圧では、アンジオテンシン II により NADPH oxidase で産生される O<sub>2</sub>により NO の分解促進が起これ、血管収縮や平滑筋の増殖と遊走が起これると考えられている<sup>18)</sup>。特に、今回用いた 2K1C は、アンジオテンシン II が上昇し、NADPH oxidase の経路から酸化ストレスが増大するために内皮機能が障害された可能

性も考えられる。一方、高血圧によって生じた O<sub>2</sub>が NO 分解を促進した結果、NO の作用が低下し、血管内皮障害が生じることが考えられるが、外因性の NO は内因性の NO の作用低下に基づく血管内皮障害を抑制する可能性がある。また、NO は細胞増殖抑制作用や血小板凝集抑制作用を有し、さらに血管透過性を低下させるなどして臓器障害進展に対して防御的に働くと考えられている<sup>19)</sup>。NO の前駆体の L-arginine を経口投与すると高脂血症や心不全患者の血管内皮機能が改善すること<sup>20,21)</sup>、そして nipradilol を経口投与することによりウサギ高脂血症モデルでの血管内皮機能の改善が認められたことが報告されている<sup>22)</sup>。しかし、本態性高血圧患者では L-arginine の投与が内皮機能を改善するかどうか明らかではなく、また、高血圧による内皮機能障害に対する L-arginine の長期投与の影響についての検討はほとんどなされていない。高血圧に対して、L-arginine あるいは外因性の NO の長期投与が高血圧性血管内皮障害を抑制することによって臓器障害を防ぐのか、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

2K1C を用い高血圧性血管内皮機能障害に対する外因性 NO の影響について検討し、以下の成績を得た。

1) 収縮期血圧は、SHAM 群に比べて他の3群は有意に上昇したが、3群間では差を認めなかった。

2) UNO<sub>x</sub>V は、SHAM 群に比べて他の3群は有意に減少したが、NIP 群は PRO 群と CONT 群より有意に増加した。

3) Ach による血管弛緩反応は、SHAM 群に比べて他の3群は有意に低下していたが、NIP 群は PRO 群と CONT 群より有意に増加した。

4) A23187 による血管弛緩反応は、SHAM 群に比べて他の3群は有意に低下していたが、NIP 群は PRO 群と CONT 群より有意に増加した。

5) SNP による血管弛緩反応は4群間で差を認めなかった。

以上の成績より、2K1C において高血圧の持続により血管内皮機能が障害されるが、外因性の NO によって高血圧性血管内皮障害が抑制されることが示唆された。

## 文 献

1. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-6.
2. Luscher TF, Raij L, Vanhoutte PM. Effect of hypertension

- and its reversal on endothelium-dependent relaxation in the rat aorta. *J Hypertension* 1987 ; 5 : S 153-5.
3. Lockette W, Otsuka Y, Carretero OA. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. *Hypertension* 1986 ; 8(Suppl II) : II361-6.
  4. Dubey RK, Boegehold MA, Gillespie DG, Rosselli M. Increased nitric oxide activity in early renovascular hypertension. *Am J Physiol* 1996 ; 270 : R 118-24.
  5. 横小路喜代司, 大塚雄司, 岡部龍也, 上松瀬勝男. Two-kidney, one-clip 腎血管性高血圧ラットにおける一酸化窒素の役割. *日腎会誌* 1997 ; 39 : 395-9.
  6. 石井利明, 大塚雄司, 岡部龍也, 上松瀬勝男. Deoxycorticosterone acetate 食塩高血圧ラットにおける一酸化窒素の役割. *日腎会誌* 1999 ; 41 : 43-8.
  7. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, Kruszelnicka-Kwiatkowska O, Kokot F, Dubiel JS, Froelich JC. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. 1999 ; 33 : 652-8.
  8. Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 1993 ; 11 : 1375-80.
  9. Ress DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* 1990 ; 101 : 746-52.
  10. Sugiyama S, Iwata M, Taki F, Hayashi K, Ozawa T. Effect of nipradilol, a new beta-blocker, on leukotriene D4-induced contraction in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am Rev Respir Dis* 1988 ; 137 : 1045-7.
  11. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982 ; 126 : 131-8.
  12. Murphy ME, Sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 10860-4.
  13. Vanhoutte PM. Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 1989 ; 13 : 658-67.
  14. Granger DL, Hibbs JB Jr, Broadnax LM. Urinary nitrate excretion in relation to murine macrophage activation. Influence of dietary L-arginine and oral NG-monomethyl-L-arginine. *J Immunol* 1991 ; 146 : 1294-302.
  15. Fenoy FJ, Quesada T, Garcia-Salom M, Romero JC, Salazar FJ. Hemodynamic effects of chronic infusion of rANP in renal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1989 ; 256 : H 1393-8.
  16. Dubey RK, Boegehold MA, Gillespie DG, Rosselli M. Increased nitric oxide activity in early renovascular hypertension. *Am J Physiol* 1996 ; 270 : R 118-24.
  17. Otsuka Y, Dipiero A, Hirt E, Brennaman B, Lockette W. Vascular relaxation and cGMP in hypertension. *Am J Physiol* 1988 ; 254 : H 163-9.
  18. Griendling KK, Minieri D, Ollerenshaw D, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994 ; 74 : 1141-8.
  19. Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ. Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998 ; 97 : 108-12.
  20. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ, Donald AE, McCredie R, Robinson J, McCarthy S, Keech A, Celermajer DS, Deanfield JE. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996 ; 97 : 1989-94.
  21. Rector TS, Bank AJ, Mullen KA, Tschumperlin LK, Sih R, Pillai K, Kubo SH. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 1996 ; 93 : 2135-41.
  22. Hayashi T, Yamada K, Esaki T, Muto E, Iguchi A. The  $\beta$  adrenoreceptor antagonist, nipradilol, preserves the endothelial nitric oxide response in atherosclerotic vessels of rabbit. *Life Sciences* 1997 ; 61 : 1379-87.