日本小児循環器学会雑誌　11巻4号　545～550頁（1995年）

摘出ブタ大動脈でのアムリノンによる一酸化窒素（NO）産生の測定

（平成6年11月7日受付）
（平成7年5月8日受理）

徳島大学医学部小児科学教室
森　一博　松岡　優　早淵　康信　黒田　泰弘
徳島大学医学部特殊栄養学教室
中屋　豊
徳島大学医学部薬剤部
土屋浩一郎

key words：アムリノン，フォルスコリン，サイクリックAMP，一酸化窒素（NO）電極，電子スピン共鳴法

要　旨

アムリノンの血管拡張作用に内皮由来弛緩因子（EDRF/NO）が関与するかどうかを調べる目的で，ブタ胸部大動脈血管片にアムリノンを投与し，NO選択的電極法および電子スピン共鳴法（ESR）により産生されるNOを測定した．

電極法では，アムリノン投与により濃度依存性にNOが産生された．NO合成阻害剤（N^G-ニトロL-アルギニン）の前処置や内皮細胞の除去によりNO産生は抑制された．同様のNO産生はアデニル酸シクラーゼを活性化するフォルスコリンおよび細胞膜透過性を有し直接サイクリックAMP（cAMP）を上昇させるジブチルcAMPでも認められた．また，培養内皮細胞でもアムリノンによるNO産生が証明された．更に，ESR法を用いても，アムリノンとフォルスコリンによりNO産生を示すシグナルが検出できた．

以上の結果から，アムリノンによるcAMP上昇は血管内皮細胞からNOを産生し，内皮依存性弛緩反応をもたらすと推定された．

はじめに

アムリノンはフォスフォジエステラーゼIIIを阻害し，サイクリックAMP（cAMP）を増加して心収縮力増強と血管拡張をもたらす薬剤である．著者らは，アムリノンの血管拡張作用には，従来から考えられてきた平滑筋細胞に対する直接作用以外に，内皮由来弛緩因子（一酸化窒素：NO）が関与することを報告した[1]．本研究では，ブタの摘出胸部大動脈断片および培養内皮細胞を用いて，NO電極法[2]および電子スピン共鳴法（ESR法）[3][4]によりアムリノン投与による血管内皮からのNO産生を測定した．

別刷請求先：（〒770）徳島市蔵本町2－50－1
徳島大学医学部小児科学教室
森　一博

対象と方法

1．NO電極による測定

屠殺場で譲り受けたブタ胸部大動脈をクレブス液の入った容器（4℃）で搬送し，直ちに実験に供した．血管は残存血液を除去し，周囲の脂肪組織と結合組織をメスで除去し1cm四方の血管片を作成した．作製した血管片は，実験開始まで95%酸素，5%二酸化炭素からなる混合ガスを通気したクレブス液の中に静置した．

NO測定装置はインターメディカル社製MODEL-501を使用した．本装置の作用電極（直径0.2mm）は3層構造のNO選択膜で覆われた白金/イリジウム合

Presented by Medical*Online

金，対極は炭素繊維で構成されている．正の電圧を作用電極に印加すると，NOは金属表面で酸化され，それに比例した拡散電流（ρA）が流れ，産生されたNOはρAで表示される[2]．

本研究に先立ち，NOドナーであるS-ニトロソ-N-アセチルペニシラミン（SNAP）を用いて本装置のNO濃度と拡散電流の関係を検討した（SNAP 1mMはNO濃度約1μMに相当する）．その結果，SNAP濃度が5μMから3mMの範囲で拡散電流は1.5ρAから1,000ρAへと直線的に増加し，以下の実験はこの範囲内で施行した．

検討した項目は以下の通りで，いずれも4検体ずつ実験を行った．

① 直径1.5cmのディッシュに20μMのL-アルギニンを添加したクレブス液（2ml）を入れた（34°C）．内皮面を上にした血管片（1×1cm）をディッシュ底に静置し，その直上に作用電極と対極を置き，アムリノン（0.5～500μM）添加後のNO産生を測定した．また，cAMPがNO産生に関与するかどうかを調べる目的で，アデニル酸シクラーゼを活性化することにより細胞内cAMPを上昇させるフォルスコリン（0.1～100μM），細胞膜を通過して直接細胞内cAMPを上昇させるジブチルcAMP（DBcAMP）（1mM）についても同様の検討を行った．

② L-アルギニンの替わりにNO合成阻害剤のN^G-ニトロL-アルギニン（L-NNA）（20μM）を予め容器内に添加し，血管片からのNO産生を検討した．また，血管片の内腔面をメスで擦過することにより内皮を除去した血管片についても検討した．

③ プロスタサイクリンはNOを産生することが知られている[5]．アムリノンによる血管弛緩反応が血管内皮細胞からのプロスタサイクリンを介する可能性を除外するため，0.1mMのアスピリンで30分間前処置した場合のNO産生を検討した．

④ Scmidtらの方法[6]に準じて，培養内皮細胞を用いた検討を行った．すなわち，20%ウシ胎仔血清を含むDMEM（Dulbecco's minimum essential medium）培養液内で血管片の内膜面をメス刃で軽くこすりディッシュ内に播き，37°CのCO_2インキュベーター中で培養した．

増殖した細胞が内皮細胞であることは，顕微鏡下での細胞の形態的観察および間接蛍光抗体法による第Ⅷ因子関連抗原の検出により判定した．その後，内皮細胞の増殖した部位を剝離して継代培養を2度繰り返し，ディッシュ内に増殖した細胞がほぼ内皮細胞のみとなったことを確認後，NOの測定を施行した．また，実験に際しては，ディッシュの培養液はクレブス液に置換し，20μMのL-アルギニンを添加した．

2．ESR法によるアムリノンのNO産生の測定

アムリノン投与によるNO産生をVaninらにより開発された電子スピン法（ESR）で定性的に測定した[3][4]．NOは常磁性を有するためESRで検出可能であるが，NO自身がきわめて不安定なため直接測定することは困難であった．しかし，トラップ剤として鉄とジエチルジチオカルバメイト（DETC）を加えることにより，NO-Fe-DETCの比較的安定なラジカルが形成され，低温でのマイクロ波照射により特有の共鳴吸収スペクトルを示す．これをスペクトロメーターで検出することによりNO産生を証明できる．

本研究では，培養内皮細胞を用いて検討を行った．まず，ディッシュ内の培養液をクレブス液に置換しデカンテーション後，クレブス液で希釈した100μMのフォルスコリンまたは250μMのアムリノン200μlを，ディッシュ底に層状に増殖した内皮細胞上に添加した．約5分間の反応後（34°C），1mMの硫酸第一鉄200μlと10mMのDETC 200μlを添加した．更に2分間の反応後（34°C），上清を径4mmのESRチューブに移し，直ちに液体窒素内で凍結した．その後，発生するESRシグナルを日本光電製スペクトロメーターで測定した．測定温度は−163±1°Cで，20mW，6.3GHzのマイクロウェーブを用いて，モデュレイション6.3 gauss，ゲイン5000で測定した．なお，positive controlとして，ニトロプルシッドを入れたウェル，negative controlとして血管片にトラップ剤のみを入れたウェルについても検討した．

各測定値は，平均値±標準誤差で表し，unpaired t-testおよびanalysis of varianceとDunnの方法を用いて，危険率5%以下を有意とした．

結　果

1．電極法によるアムリノンによるNO産生の測定

500μMのアムリノン投与により迅速かつ持続的なNO産生を認めた（図1A）．アムリノンの投与量を減じるとNO産生も有意に低下し（図1B），0.5μMのアムリノンでは有意なNO産生は検出されなかった（表，上段）（図2）．

0.1mMのアスピリンによる前処置の有無では，最高電流には有意差を認めなかった（図1C）．

20μMのL-NNAで前処置すると，アムリノンによ

Presented by Medical*Online

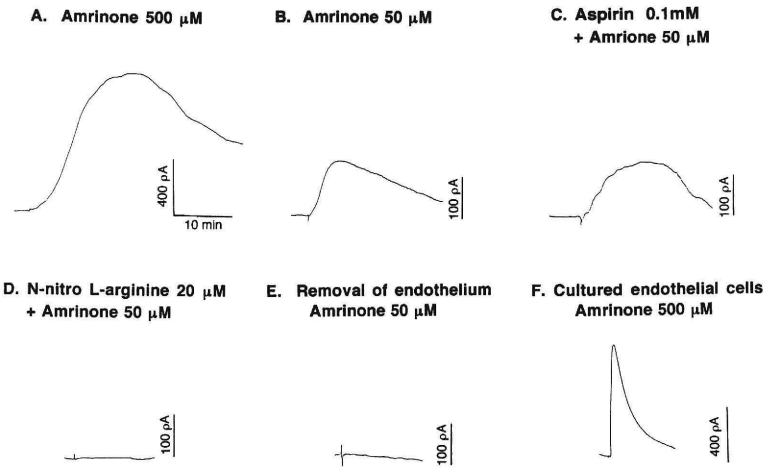

図1　摘出ブタ胸部大動脈におけるアムリノンによるNO産生
A：500μMアムリノンでは数十分持続するNO産生を認めた．B：アムリノン濃度を減少すると，NO産生量も低下した．C：アスピリンの前処置で，NO産生の有意な減少は認めなかった．D：L-NNAで前処置すると，NO産生は抑制された．E：また，内皮を除去した血管でもNO産生は阻害された．F；培養内皮細胞でもアムリノンによるNO産生が確認された．

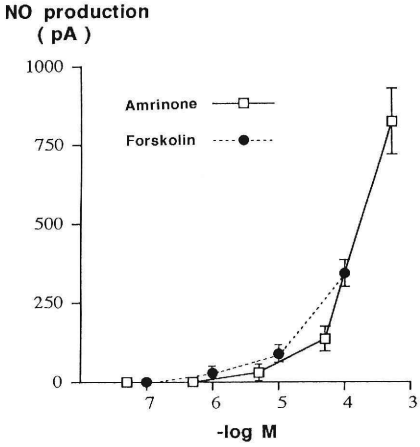

図2　アムリノンおよびフォルスコリン濃度と産生されるNO濃度の対比
両者とも濃度依存性にNOが産生された．

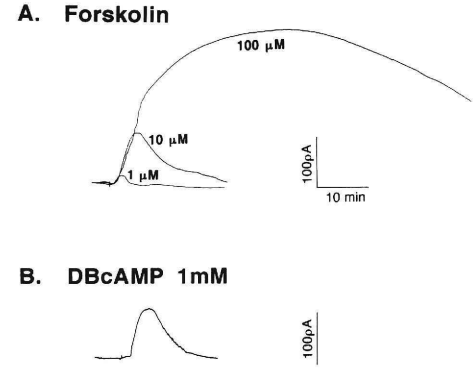

図3　摘出ブタ胸部大動脈におけるフォルスコリンおよびDBcAMPのNO産生
A：フォルスコリンは濃度依存性にNOを産生した．
B：DBcAMPでもNO産生が確認された．

るNO産生は抑制された（図1D）（表，上段）．また，内皮細胞の除去によってもほぼ完全にNO産生が抑制された（図1E）．

培養内皮細胞でもアムリノンの濃度依存性にNOが産生させた．500μMのアムリノンでのピーク電流は523±74ρA（図1F），50μMで78±65ρA，5μMで21±18ρAであった．

2．フォルスコリンおよびDBcAMPによるNO産生

100μMのフォルスコリンでは，最大電流323±42ρAで数十分持続するNO産生を認めた．投与するフォルスコリンを減じると，NO産生は有意に低下した（図2，3A）．20μMのL-NNAで前処置するとフォルスコリンによるNO産生は抑制された（表，下段）．1mMのDBcAMPでも，最高電流105±24ρAのNO産生を

Presented by Medical*Online

表　ラット胸部大動脈リング状標本でのアムリノンおよびフォルスコリンによるNO産生

A．アムリノン

	産生されるNO（pA）			
アムリノン	0.5μM	5μM	50μM	500μM
20μML-アルギニン	n.d.	30±18*	136±39**	824±104**
20μML-NNA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20μML-アルギニン＋0.1mMアスピリン	n.d.	40±12*	121±56**	749±162**

**p<0.01，*p<0.05（0.5μMアムリノンでの値と対比）
n.d.＝not detectabe

B．フォルスコリン

	産生されるNO（pA）			
フォルスコリン	0.1μM	1μM	10μM	100μM
20μML-アルギニン	n.d.	28±11*	88±29**	324±42**
20μML-NNA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

**p<0.01，*p<0.05（0.1μMフォルスコリンでの値と対比）
n.d.＝not detectabe

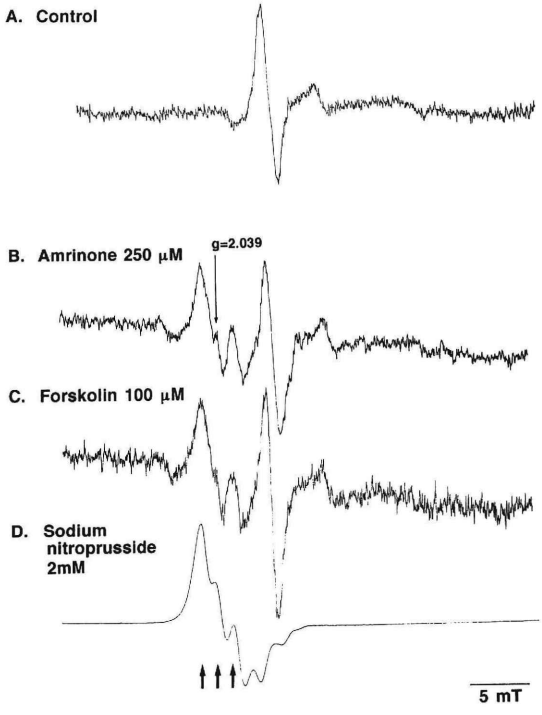

図4　培養内皮細胞でのアムリノンおよびフォルスコリンのNO産生のESR法による検出
トラップ剤のみ(A)ではNO産生は認められなかった．アムリノン（B）およびフォルスコリン（C）投与により，ニトロプルシッド(D)と同一の磁場に3峰性のNO-Fe-DETCによるシグナル(矢印)を検出した．

認めた（図3B）．

3．ESR法によるNO測定

DETCとFeをトラップ剤として用いてアムリノンおよびフォルスコリンから産生されるNOをESR法により定性的に測定した．NOは，NO-Fe-DETCの形で，g＝2.039近傍の磁場に3峰性のシグナル[3)4)]として認められた．DETCとFeのみを培養内皮細胞に添加した場合は，このシグナルは認められなかった（図4A）．アムリノン（図4B）またはフォルスコリン（図4C）を添加すると，g＝2.039近傍にカップリング・コンスタント（a_N）＝13gaussの3峰性シグナルを検出した．このシグナルはニトロプルシッドを添加した場合（positive control）に一致していた．

考　察

著者らはラット大動脈に対するアムリノンの弛緩実験で，低濃度では内皮を有する血管の弛緩が内皮を除去した血管よりも大であること，弛緩に伴いcGMPの上昇を認めること，その弛緩反応は内皮を有する血管のみL-NNAで抑制されることから，アムリノンの血管弛緩には内皮依存性作用が関与する可能性を指摘した[1)]．

本研究では，NO電極法およびESR法により，アムリノンによる内皮細胞からのNO産生を直接確認した．NO電極法ではゼロ点を決めることができないため，定常状態で常に産生されているNO（basal NO）は測定できず，アムリノン投与後の相対的なNO産生のみを測定することになる．また，僅かな振動もノイ

Presented by Medical*Online

ズとなるため撹拌ができず，測定容器内のアムリノンの濃度は拡散により一定となる．そのため，アムリノン投与後，容器内の濃度が均一となるまでの時間は実験ごとに若干異なる可能性がある．しかし，今回血管片を用いた実験では，いずれも投与直後から急速にNOが産生される例はなく，数分以上かけて次第にNO濃度が上昇しており，アムリノン投与後の血管内cGMP量の上昇の経時的変化（投与後，5～10分でピークとなる）[1]に類似した結果となった．なお，ラット大動脈切片（1cm長）を用いた場合も，作用電極を血管腔に挿入することにより，定性的にNO産生が確認された（未発表）．

ESR法においても，アムリノンによりニトロプルシッドと同一部位に3峰性のシグナルを生じ，アムリノンにより血管内皮細胞からNOが産生されることが証明された．本法は，現時点では定量性に乏しく，また血管片では種々のラジカルの混入によりノイズが大となり測定が困難で，培養細胞での検討が望ましい．また，トラップ剤を入れて測定するため，NO電極法とは異なりひとつの標本での経時的変化を測定することは出来ない．しかし測定条件の改良，新しいトラップ剤の開発により更に高感度の検査法となると期待されている．

本研究により，cAMPを上昇させるフォルスコリン・DBcAMPでもNOが産生されることが示された．最近，Grayらはイソプロテレノールによる血管弛緩実験から，イソプロテレノールがβレセプターを介して内皮細胞のcAMPを上昇させ，更にNO産生・平滑筋のcGMP上昇をもたらし血管拡張を生じると報告した[7]．著者らの研究では，NOを直接測定することによりGrayらの説を支持する結果を得ることができた．

アムリノンをはじめとするPDEIII阻害剤の血管弛緩の機序には未だ定説がない．Lugnierらはラット大動脈を用いた検討で，血管内皮細胞の有無によりミルリノンによる血管弛緩反応には差がなく，NO合成阻害剤による影響は受けなかったと報告した[8]．一方，Clarkeらは家兎大動脈を用いた検討で，アムリノンによる血管弛緩反応は内皮を除去した血管に比して内皮を有する血管で大であると指摘した[9]．今回の研究結果は後者の説に一致した．すなわち，アムリノンの血管拡張作用は，従来から知られている平滑筋細胞のcAMP上昇による直接作用[10][11]以外に，血管内皮細胞からのNO産生が関与すると推定された．

PDEアイソザイムの細胞内分布は動物の種類により異なり，ヒトなどの内皮細胞での分布は不明である[12]．また，アムリノンはPDEIII阻害剤に分類されるが，他のアイソザイムに対する阻害作用も若干有しており[13]，それらがどの程度影響を及ぼすかは不明である．更に，cAMPの上昇がどのような機序でNO産生を促すかについても不明である．これらの点は今後検討してゆきたい．

稿を終えるにあたり，御指導賜りました徳島大学薬学部薬物学教室守時英喜教授，武内正吾先生に深謝いたします．なお，本論文の要旨は第58回日本循環器学会総会（平成6年3月28日，東京）および第12回世界心臓病学会（平成6年9月13日，ベルリン）において発表した．

文　献

1) 森　一博，松岡　優，早淵康信，黒田泰弘，中屋豊：摘出ラット大動脈に対するアムリノンの内皮依存性血管拡張作用と加齢による影響．日小循誌 1995；11：536—544
2) Malinski T, Taha Z: Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. Nature 1992；358：676—678
3) Voevodskaya NV, Vanin A: Gamma-irradiation potentiates L-arginine-dependent nitric oxide formation in mice. Biochem Biophys Res Commun 1992；186：1423—1428
4) Tominaga T, Sato S, Ohnishi T: Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and tocal cerebral ischemia in the rat: In vivo detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. Brain Res 1993；614：342—346
5) Braun M, Schror K: Prostaglandin D_2 relaxes bovine coronary arteries by endothelium dependent nitric oxide-mediated cGMP formation. Circ Res 1992；71：1305—1313
6) Schmidt K, Mayer B, Kukovertz WR: Effect of calcium on endothelium-derived relaxing factor formation and cGMP levels in endothelial cells. Europ J Pharmacol 1989；170：157—166
7) Gray DW, Marshall I: Novel signal transduction pathway mediating endotheium-dependent β-adrenoceptor vasorelaxation in rat thoracic aorta. Br J Pharmacol 1992；107：684—690
8) Lugnier C, Komas N: Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: Role in vasodilatation. Europ Heart J 1993；14 (Suppl I)：141—148
9) Clarke WR, Soltow LO: Amrinone causes

Presented by Medical*Online

vasodilation by both endothelium-independent and endothelium-dependent mechanisms in small pulmonary arteries. Am Rev Resp Disease 1991; 143: A773
10) Honerjager P: Pharmacology of positive inotropic phosphodiesterase III inhibitors. Europ Heart J 1989; 10 (Suppl C): 25—31
11) Meisheri KD, Palmer RF, Breemen CV: The effects of amrinone on contractility, Ca^{2+} uptake and cAMP in smooth muscle. Eur J Pharmacol 1980; 61: 159—165
12) Nicholson CD, Challiss RAJ, Shahid M: Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. TiPS 1991; 12: 19—27
13) 大内章吉, 長田直美, 鹿島幸子：アムリノンの陽性変力作用発現のメカニズム. 薬理と治療　1990; 18: 2211—2218

Detection of NO Production in Porcine Thoracic Aorta after Administration of Amrinone

Kazuhiro Mori[1], Suguru Matsuoka[1], Yasunobu Hayabuchi[1], Yasuhiro Kuroda[1], Yutaka Nakaya[2] and Kouichiro Tsuchiya[3]
[1]Department of Pediatrics, [2]Laboratory of Nutrition in Particular Status, Department of Nutrition, and [3]Department of Pharmacy, School of Medicine, University of Tokushima

Nitric oxide (NO) production after administration of amrinone was detected by NO-selective electrode and electron spin resonance (ESR) mothod. Dose-dependent NO production by amrinone in porcine thoracic aorta was observed using an NO selective electrode. Pretreatment with N^G-nitro L-arginine (L-NNA) or removal of the endothelium completely suppressed NO production from aorta induced by amrinone.

Forskolin (activator of adenylate cyclase) and dibutyl cyclic AMP (stable cAMP derivative) also induced NO production. NO production induced by amrinone and forskolin was confirmed by ESR mothod, using diethyl-dithio-carbamate (DETC) and Fe as spin-trapping agents.

These results showed that an increase of cAMP by amrinone enhances the release of NO from endothelium, and induces endothelium-derived relaxing factor/NO mediated vasodilation.

Presented by Medical*Online