インスリンの内皮依存性血管拡張作用に関する検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 清川, 裕明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9240

金沢大学十全医学会雑誌　第105巻　第5号　658－672（1996）

インスリンの内皮依存性血管拡張作用に関する検討

金沢大学医学部医学科内科学第一講座（主任：小林健一教授）
清　川　裕　明

インスリンは種々の心血管作用を示すことが知られており，その重要な作用の1つに血管拡張作用があるがその機序は明らかではない．本研究では，インスリンの血管拡張作用の機序を明らかにするため，内皮依存性血管拡張に及ぼすインスリンの影響を検討した．家兎摘出大腿動脈のらせん条片を作製し，36℃，pH7.4 の修正 Krebs 液を満たした組織灌流浴槽に懸垂し，等張性収縮を記録し以下の検討を行った．すなわち，セロトニン (serotonin, 5HT)，ノルエピネフリン (norepinephrine, NE) および高カリウムによる血管収縮の用量－反応曲線に及ぼす種々の濃度のインスリン (1mU/ml, 40mU/ml, 100mU/ml) の影響を内皮温存標本と内皮剝離標本で比較した．次に，インスリンの血管拡張作用におけるプロスタグランジン，一酸化窒素 (nitric oxide, NO) の役割を明らかにするため，内皮温存標本を用い，5HT, NE と高Kによる血管収縮の用量－反応曲線に及ぼすインスリンの効果を，アスピリン 10^{-5} M または N^{ω}-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME) 10^{-4} M の前処置前後で比較した．さらに 5HT, NE および高Kの中間有効濃度 (median effective dose, ED_{50}) での前収縮に対するアセチルコリン (acetylcholine, Ach) とサブスタンス P (substance P, SP) による内皮依存性拡張反応に対するインスリン 100mU/ml の影響を検討した．内皮温存標本において，インスリン 40mU/ml 以上の前投与により 5HT, NE および高カリウムの収縮は抑制され，用量－反応曲線は右方に偏位した．内皮剝離標本でも，インスリン 40mU/ml 以上の前投与により 5HT, NE および高Kの低濃度での収縮を抑制した．しかし，その収縮抑制の程度はいずれの収縮物質においても，内皮剝離標本に比べ内皮温存標本で大きかった．アスピリンの前投与によりインスリンによる 5HT, NE および高Kの収縮に対する抑制は変化しなかったが，L-NAME の前投与によりいずれの収縮物質においてもインスリンの収縮抑制作用は減弱した．5HT, NE および高Kの前収縮に対する Ach および SP の内皮依存性拡張反応は，インスリン 100mU/ml の前投与によりいずれも有意に増強した．以上よりインスリンの血管拡張作用は，内皮非依存性血管拡張作用に加え，内皮依存性拡張作用によるものと思われた．

Key words insulin, endothelial-dependent vasodilator action, endothelial-in-dependent vasodilator action, isolated rabbit femoral artery

インスリンは，低血糖のない状態においても種々の心血管作用を有することが知られている[1)~3)]．近年肥満を伴った高血圧では，インスリン抵抗性，高インスリン血症がみられ，さらに肥満のない本態性高血圧や高血圧の家族歴を有する正常血圧者でも高頻度にインスリン抵抗性を示すことが報告された[4)5)]．これらの疫学調査から，高インスリン血症が本態性高血圧発症の成因の一つとなる可能性が示され，いわゆるインスリン仮説として注目されている[6)]．インスリンの昇圧機序としては，腎臓の尿細管におけるナトリウム再吸収の促進[7)]，交感神経活動刺激[8)9)]と血管平滑筋増殖作用[10)]が明らかにされている．しかしヒトやイヌにおいてはインスリン投与により昇圧しないとの成績が報告され[11)12)]，これはインスリンの持つもう一つの重要な心血管作用である血管拡張作用により，昇圧機序が相殺されたためと考えられる[13)]．しかし，肥満を伴った高血圧患者ではインスリンに対する血管拡張反応に障害がみられることが報告され，遺伝的あるいは環境的に規定された血管反応の差が昇圧に関与する可能性が示唆されている[4)~6)]．このように，インスリンの血管拡張反応とその障害は，本態性高血圧の成因を考える上で極めて重要な臨床上の問題となっているが，その機序については一定の見解は得られていない．

インスリンの血管拡張反応の機序としてはこれまでβ交感神経刺激作用[1)14)]，Na^+, K^+-ATPase の活性化[15)]，Ca^{2+}-ATPase の活性化[16)]および骨格筋酸素消費量の増加に伴う二次的な代謝性血管拡張[17)]などが報告されているが，結論は得られていない．一方，近年ヒトの上肢または下肢灌流標本を用いた検討[18)19)]において，インスリンの血管拡張反応が内皮由来血管拡張因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF)[20)]である一酸化窒素 (nitric oxide, NO)[21)]の合成阻害物質により抑制されることが報告され，インスリンが血管内皮にも作用する可能性が示され注目されている．しかし，インスリンの血管内皮に対する作用に関して系統だった実験的証明はみられない．

そこで今回，内皮依存性血管拡張反応に及ぼすインスリンの

平成8年9月20日受付，平成8年10月23日受理

Abbreviations: Ach, acetylcholine; ED_{50}, median effective dose; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDRF, endothelium-derived relaxing factor; 5HT, 5-hydroxytryptamin (serotonin); L-NAME, N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester; NE, norepinephrine; PG, prostaglandin; SP, substance P; TXA_2, thromboxane A_2

影響を明らかにするために，摘出家兎大腿動脈を用い以下の検討を行った．すなわちセロトニン (serotonin, 5HT)，ℓ-ノルエピネフリン (norepinephrine, NE) と高カリウムの血管収縮の用量ー反応曲線に及ぼすインスリンの影響を内皮温存標本と内皮剥離標本で比較した．次に，インスリンの血管拡張作用における EDRF であるプロスタグランジン (prostaglandin, PG)[22)23)] と NO の役割を明らかにするため，内皮温存標本を用い 5HT, NE と高Kによる血管収縮のインスリンによる抑制効果に及ぼすアスピリンまたは N^{ω}-ニトロ-L-アルギニンメチルエステル (N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)[24)] の影響を検討した．さらに 5HT, NE および高Kの中間有効濃度 (median effective dose, ED_{50}) での前収縮に対するアセチルコリン (acetylcholine, Ach) とサブスタンス P (substance P, SP) による内皮依存性拡張反応に及ぼすインスリンの効果を検討した．

対象および方法

I．対象および血管標本の作製

体重 3.0～3.5kg の雄家兎 (日本白色種，北陸実験動物，石川) 40羽を対象とした．ペントバルビタール　ナトリウム (田辺，大阪) 30mg/kg の静脈内投与による麻酔後，脱血し大腿動脈を摘出した．同標本を 36℃，pH7.4 の修正 Krebs 液 (NaCl 122.0mM, KCl 4.7mM, $CaCl_2$ 2.5mM, $MgSO_4$ 1.2mM, KH_2PO_4 1.2mM, $NaHCO_3$ 15.5mM，ブドウ糖 11.5mM) を満たしたビーカー中に入れ，95%O_2-5%CO_2の混合ガスで通気した．標本摘出後 1 時間以内に氷冷した修正 Krebs 液中で解剖用顕微鏡 227418 (オリンパス，東京) を用い周囲の結合組織を十分剥離し，らせん条片 (幅約 1mm，長さ約 15mm) を作成した．らせん条片は修正 Krebs 液を満たした組織灌流浴槽 (20ml) 内に懸垂し，浴槽内は 95%O_2-5%CO_2 の混合ガスで通気し，36.0±0.2℃，pH7.4 に維持した．らせん条片に 0.5g の初期張力をかけて，アイソトニックトランスジューサー TD112S (日本光電，東京) を用い等張性収縮をオシログラフリニアコーダー WR3001 型 (渡辺機器，東京) 上に記録した (図 1)．30分間隔で修正 Krebs 液を交換し，90分後より高 K 40mM にて収縮させた．その後修正 Krebs 液を20分間隔で交換し，60分後再び高 K 40mM の収縮反応を求めた．この操作を繰り返し収縮反応が一定したのを確認した後，実験を開始した．各薬剤の投与はマイクロシリンジで直接組織灌流浴槽内に累積投与した．薬剤濃度はすべて組織灌流浴槽内の濃度として示し，高 K 40mM の収縮を100%として，各実験で得られた収縮の程度を標準化した．なお，各薬物による収縮反応の検討は20分間隔で行い，その間 3 回修正 Krebs 液で標本を洗浄した．

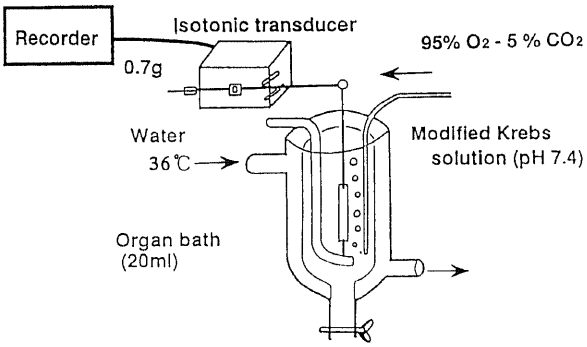

Fig. 1. Schema of measurement of isotonic contraction. Helical strips were bathed in 20 ml of modified Krebs solution (pH 7.4) gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 and isotonic contraction was measured.

II．5HT, NE，高Kの用量ー反応曲線に及ぼすインスリンの影響：内皮温存標本と内皮剥離標本の比較

ラセン標本作成後，標本の一部は Furchgott ら[20)] の方法に従い，修正 Krebs 液で濡らした濾紙で大腿動脈の内膜側を擦過し内皮の剥離を機械的に行った．内皮を剥離した標本 (n=15) と内皮を温存したラセン標本 (n=15) を組織灌流浴槽内に装着し，5HT と NE のそれぞれ 10^{-10}M, 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M, 10^{-5}M および高Kの 10, 20, 30, 40mM を累積投与し，用量ー反応曲線を求めた．次にインスリン 1, 40, 100mU/ml で20分間前処置した後，各濃度において 5HT, NE および高Kの用量ー反応曲線を求めた．得られた用量ー反応曲線より，小池らの方法[25)] に従い，pD_2 値 (最大反応の 50%反応を引き起こすのに必要な薬剤のモル濃度の自然対数を

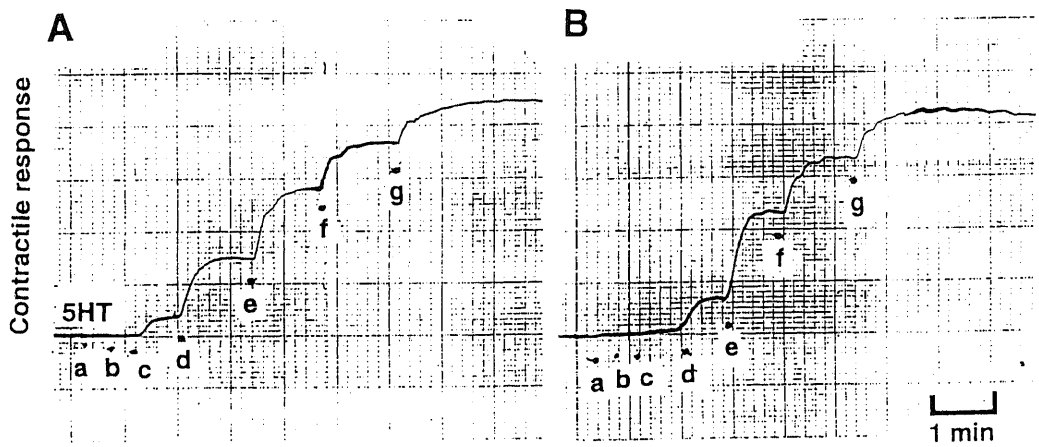

Fig. 2. Experimental records showing effects of insulin on vasoconstrictive responses to 5HT in isolated femoral artery with endothelium. (A) Control strips. (B) Strips with insulin (100 mU/ml) pretreatment 20 min before the addition of 5HT. The concentrations of 5HT in the bath were 10^{-10}M (a), 5×10^{-9}M (b), 2×10^{-8}M (c), 10^{-7}M (d), 5×10^{-7}M (e), 2×10^{-6}M (f) and 10^{-5}M (g). 5HT, serotonin.

負にした値) を求め比較検討した．なおインスリン投与下の5HT, NE，高Kの用量ー反応曲線を求めた後，修正 Krebs 液中で60分間静置後に再度 5HT, NE，高Kの投与を行い用量ー反応曲線を求め，最初のインスリン非投与時の用量ー反応曲線と差がないことを確認した．

Ⅲ．インスリンの血管作用に対するアスピリン投与の影響

内皮温存標本 (n=10) に対してアスピリン 10^{-5}M を前投与し，20分後対照としてインスリンと同量の蒸留水 0.1ml を追加し20分後に 5HT と NE をそれぞれ 10^{-10}M, 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M, 10^{-5}M および高 K10, 20, 30, 40mM を投与し用量ー反応曲線を求めた．次に修正 Krebs 液で標本を洗浄後にアスピリン 10^{-5}M を前投与し20分後にインスリン 100mU/ml を追加投与し，さらに20分後に再度 5HT, NE および高Kの用量ー反応曲線を求めた．

Ⅳ．インスリンの血管作用に対する L-NAME 投与の影響

内皮温存標本 (n=10) に対して L-NAME 10^{-4}M を前投与し，20分後対照としてインスリンと同量の蒸留水 0.1ml を追加し，20分後に 5HT と NE のそれぞれ 10^{-10}M, 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M, 10^{-5}M および高Kの 10, 20, 30, 40mM を投与し用量ー反応曲線を求めた．次に修正

Table 1. Effects of insulin on the contractions to serotonin in strips with and without endothelium

Treatment	Percent contraction of potassium[a]-induced contraction ($\bar{x}$ ±SEM, n=15)						
	Concentration of serotonin (M)						
	10^{-10}	5×10^{-9}	2×10^{-8}	10^{-7}	5×10^{-7}	2×10^{-6}	10^{-5}
Strips with endothelium							
Control	0	2.6±0.7	16.8±2.1	53.9±3.9	83.9±3.7	97.4±4.1	105.2±3.7
Insulin (mU/ml)							
1	0	1.7±0.4	13.8±1.7	53.5±4.7	83.6±5.3	97.1±4.2	105.3±3.7
40	0	0.7±0.2*	12.1±1.9*	44.7±3.7*	75.2±3.1*	95.7±4.5	104.6±4.2
100	0	0.0±0.0†	6.4±1.8†	41.3±4.7*	74.9±3.8*	93.0±4.1	102.3±3.8
Strips without endothelium							
Control	0	3.6±0.5	25.8±3.2	63.4±4.7	95.1±6.3	118.4±5.5	130.4±4.6
Insulin (mU/ml)							
1	0	2.4±0.3	25.2±3.1	63.3±4.3	95.5±5.6	117.8±5.5	129.0±5.0
40	0	1.7±0.4†	20.2±3.2†	62.9±4.1	93.6±4.7	116.1±5.3	129.1±4.5
100	0	1.5±0.4†	18.7±2.4†	59.0±4.7*	91.5±4.2	115.1±4.4	128.4±4.5

a) Concentration, 40mM.
*, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin.

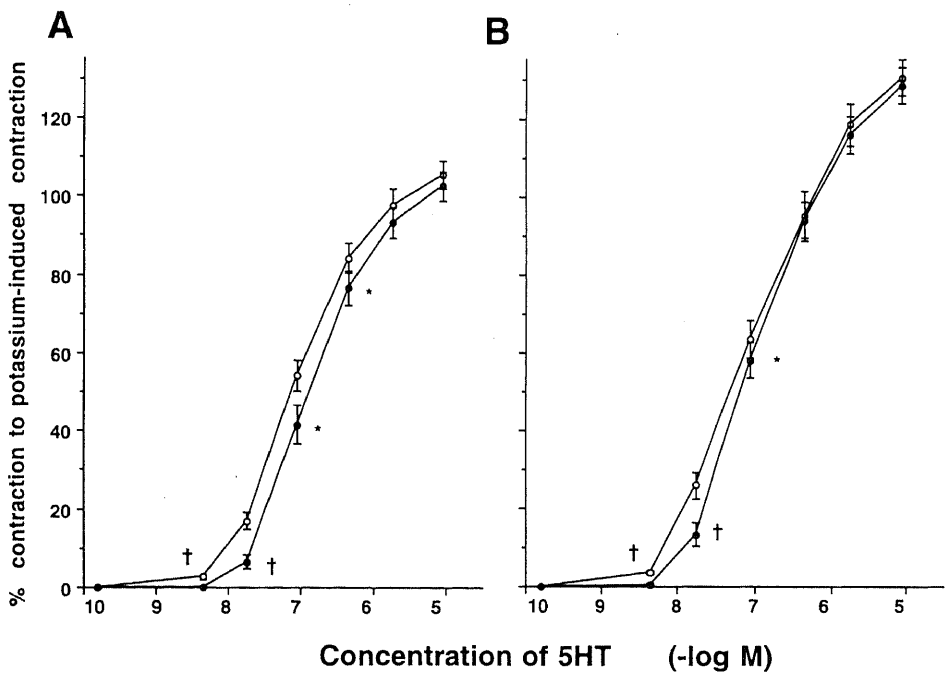

Fig. 3. Effects of insulin (100 mU/ml) on 5HT-induced contraction with (A) and without (B) endothelium. Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 15 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control ; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin. 5HT, serotonin.

Krebs 液で標本を洗浄後に L-NAME 10^{-4}M を前投与し，20分後にインスリン 100mU/ml を追加投与し，20分後に再度 5HT, NE および高Kの用量－反応曲線を求めた．

V．Ach および SP の内皮依存性血管拡張作用に対するインスリンの影響

内皮温存標本 (n=15) を 5HT, NE および高Kの最大収縮の50%の収縮を起こすのに必要な濃度 (ED_{50}) にて前収縮させた．この前収縮下に Ach を 10^{-9}M, 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M, 10^{-5}M 投与し，各標本における Ach の用量－反応曲線を求めた．同様に ED_{50} の濃度での 5HT, NE および高Kにて前収縮させ，SP を 2×10^{-8}M, 3×10^{-7}M, 2×10^{-6}M 投与し各標本における SP の用量－反応曲線を求めた．次に修正 Krebs 液を交換し，インスリン 100mU/ml を前投与し，20分間後に ED_{50} の濃度での 5HT, NE および高Kにて前収縮させ，Ach および SP の用量－反応曲線を求めた．なお，インスリン前投与下の Ach と SP の用量－反応曲線を求めた後，修正 Krebs 液中で60分間の静置後に再度 Ach と SP の用量－反応曲線を求め，最初のインスリン非投与下での用量－反応曲線と

Table 2. Effects of insulin on the contractions to norepinephrine in strips with and without endothelium

Treatment	Percent contraction of potassium[a)]-induced contraction ($\bar{x}\pm$SEM, n=15)						
	Concentration of norepinephrine (M)						
	10^{-10}	5×10^{-9}	2×10^{-8}	10^{-7}	5×10^{-7}	2×10^{-6}	10^{-5}
Strips with endothelium							
Control	0	17.6±3.2	54.3±5.5	92.8±5.0	118.3±4.5	131.2±4.8	137.4±4.7
Insulin (mU/ml)							
1	0	16.1±2.8	52.2±5.4	91.6±3.9	118.7±3.4	131.3±3.1	137.2±3.1
40	0	11.7±1.5†	48.5±4.2	91.3±4.5	117.4±4.4	129.2±4.4	136.4±4.5
100	0	6.2±1.3†	42.9±4.3†	85.4±4.6*	112.2±4.0	126.4±3.5	134.3±3.3
Strips without endothelium							
Control	0	24.7±1.6	75.1±3.3	107.6±3.2	129.4±3.5	146.4±3.9	160.1±3.2
Insulin (mU/ml)							
1	0	23.6±1.6	75.2±2.7	107.6±2.4	129.7±3.4	145.5±3.6	160.2±2.9
40	0	20.1±1.9†	73.3±3.0	105.3±1.9	127.9±3.4	145.0±3.1	159.2±4.4
100	0	16.4±2.0†	67.2±2.8*	104.4±3.7	126.5±4.3	144.6±4.1	158.4±307

a) Concentration, 40mM.
*, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin.

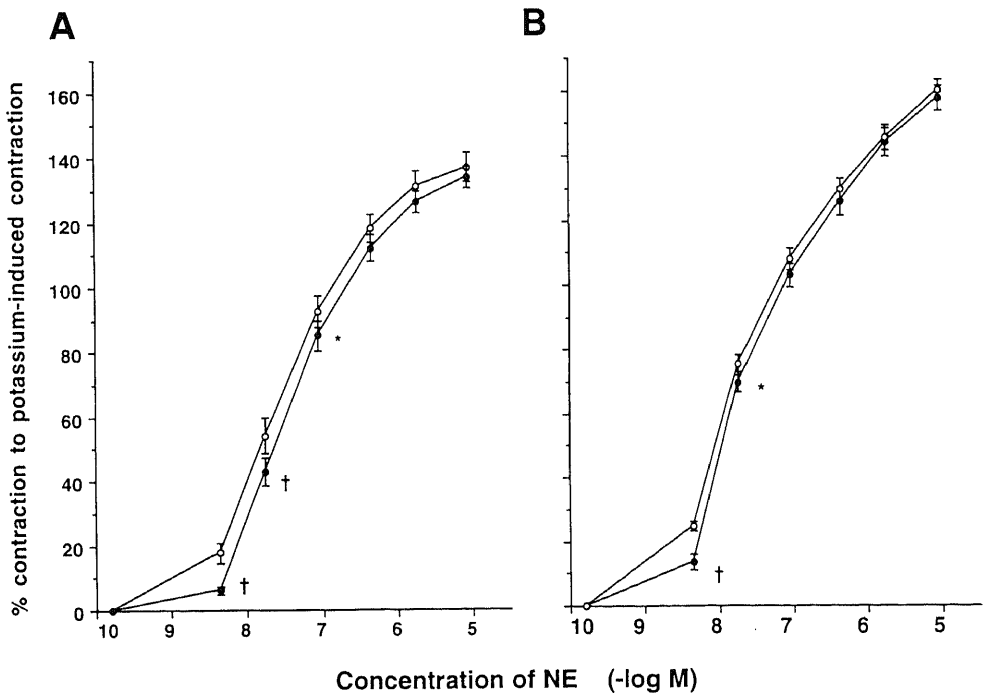

Fig. 4. Effects of insulin (100 mU/ml) on NE-induced contraction with (A) and without (B) endothelium. Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 15 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control ; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin. NE, norepinephrine.

差がないことを確認した.

Ⅵ. 使用薬剤

使用した薬剤は，豚モノコンポーネントインスリン結晶 (Novo, Bagsvaerd, Denmark), 5HT (Sigma, ST. Lóuis, USA), NE (和光薬品，東京)，塩化カリウム (和光薬品), Ach(第一製薬，東京), SP (Sigma)，アスピリン (ミドリ十字，東京), L-NAME (Sigma) である.

Ⅶ. 統計学的検討

結果は平均値±標準誤差 ($\bar{x}$ ±SEM) で示し，各群間の平均値の差の検定は一元配置，二元配置による分散分析後 Sheffé の多重比較を行い，危険率が0.05未満を有意差ありとした.

成 績

Ⅰ. 5HT, NE，高Kの用量ー反応曲線に及ぼすインスリンの影響：内皮温存標本と内皮剝離標本の比較

図2にインスリン 100mU/ml 投与前後の 5HT の収縮反応の内皮温存標本における実例を示した. さらに 5HT の収縮に及ぼすインスリンの影響を内皮の有無により比較した成績を表

Table 3. Effects of insulin on the contractions to potassium in strips with and without endothelium

Treatment	Percent contraction of potassium[a)]-induced contraction ($\bar{x}$ ±SEM, n=15)			
	Concentration of potassium (mM)			
	10	20	30	40
Strips with endothelium				
Control	5.3±2.0	31.7±4.7	94.0±1.8	100.0±0.0
Insulin (mU/ml)				
1	2.7±0.4	29.0±3.4	92.5±1.6	100.1±0.5
40	0.7±0.2*	21.1±1.3*	90.0±1.6	99.2±0.6
100	0.6±0.3*	19.0±1.7*	88.7±1.7*	97.6±1.2
Strips without endothelium				
Control	5.8±1.4	39.5±4.5	100.1±2.1	106.5±2.3
Insulin (mU/ml)				
1	5.6±1.5	38.5±3.9	99.3±2.5	105.4±2.6
40	4.0±1.0	35.7±4.6	99.4±2.4	104.8±2.5
100	1.9±0.8*	34.4±4.5	98.5±1.9	104.9±2.1

a) Concentration, 40mM.
*, $p<0.05$ between control and insulin.

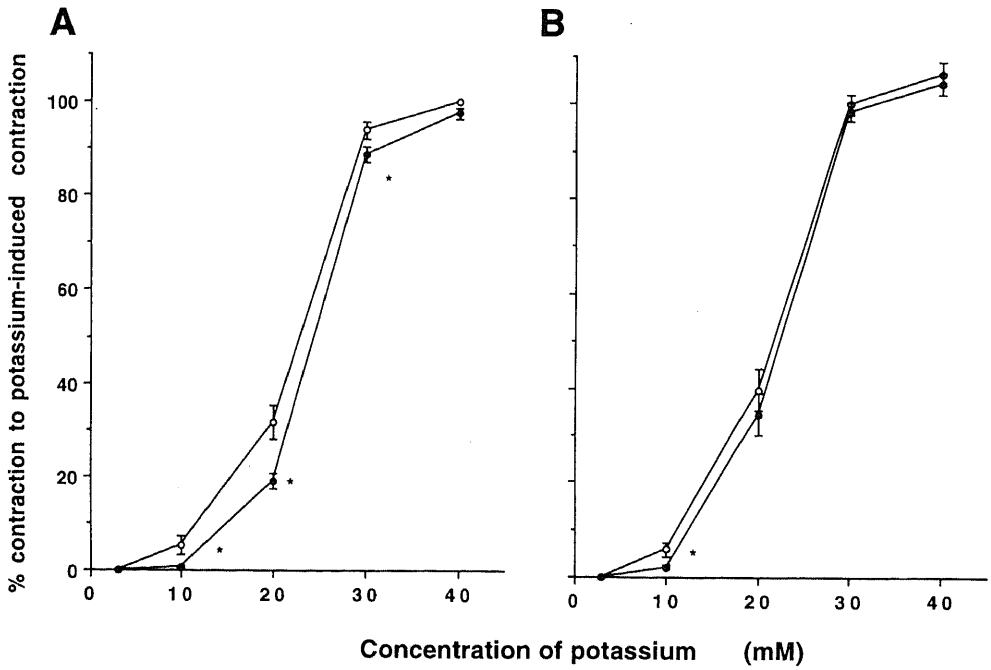

Fig. 5. Effects of insulin (100 mU/ml) on potassium-induced contraction with (A) and without (B) endothelium. Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 15 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin.

1，図3に示した．5HT の最大収縮は，内皮温存標本では 105.2±3.7% に対して剥離標本では 130.4±4.6% と，内皮剥離標本で有意に大であった ($p<0.005$). 5HT の用量－反応曲線に及ぼすインスリンの影響では，内皮温存標本でインスリン 1mU/ml では有意な変化はなかったが，40mU/ml では 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M で有意に抑制された (それぞれ $p<0.05$). さらにインスリン 100mU/ml では，5×10^{-9}M から 5×10^{-7}M において有意な抑制がみられた (5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, $p<0.01$; 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, $p<0.05$). 内皮剥離標本では，インスリン 1mU/ml による有意な変化はなかったが，40mU/ml では 5HT の収縮は 5×10^{-9}M と 2×10^{-8}M で有意に抑制され (それぞれ $p<0.01$), 100mU/ml では 5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M で有意に抑制された (それぞれ $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$). pD_2値は，内皮温存標本において，インスリン非投与 7.03±0.02 に対してインスリン 40mU/ml では 6.96±0.03 ($p<0.05$), 100mU/ml では 6.90±0.03 ($p<0.01$) といずれも有意な低下がみられ (表4), 5HT の用量－反応曲線は右方に偏位した．内皮剥離標本でもインスリン 100mU/ml で 6.99±0.03 とインスリン非投与 7.06±0.03 に対して有意な低下がみられた ($p<0.05$, 表4). インスリン 100mU/ml 投与による 5HT 収縮の抑制を内皮の有無により比較すると，5HT の 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M で内皮温存標本に比べ内皮剥離標本で抑制の程度は有意に減少した (それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.05$, 図 8A).

NE の最大収縮に及ぼすインスリンの影響を内皮の有無により比較した成績を表2，図4に示した．NE の最大収縮は，内皮温存標本では 137.4±4.7% に対して剥離標本では 160.1±3.2% と剥離標本で有意に大であった ($p<0.005$). 内皮温存標本ではインスリン 1mU/ml では NE 収縮に変化はなかったが，40mU/ml では 5×10^{-9}M にて有意な抑制がみられた ($p<0.01$). インスリン 100mU/ml では，5×10^{-9}M, 2×10^{-8}M, 10^{-7}M において NE 収縮は有意に抑制された (それぞれ $p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$). 内皮剥離標本では，インスリン 1mU/ml では NE 収縮に変化はなかったが，40mU/ml では 5×10^{-9}M で有意に抑制された ($p<0.01$). インスリン 100mU/ml では 5×10^{-9}Mと 2×10^{-8}M で NE 収縮が有意に抑制された ($p<0.01$, $p<0.05$). pD_2値は，内皮温存標本においては，インスリン非投与時 7.54±0.02 からインスリン 40mU/ml では 7.48±0.03 ($p<0.05$), インスリン 100mU/ml で 7.47±0.03 ($p<0.05$) と有意に低下し (表4), NE の用量－反応曲線は右方に偏位した．内皮剥離標本ではインスリン非投与時 pD_2 値は 7.60±0.02 であり，いずれの濃度のインスリン投与によっても pD_2 値に有意な変化はなかった (表4). 内皮の有無による比較では，インスリン 100mU/ml 投与において 10^{-7}M と 5×10^{-7}M での NE 収縮のインスリンによる抑制は，内皮温存標本に比較して内皮剥離標本で有意に低下していた (それぞれ $p<0.05$, 図 8B).

高Kの最大収縮に及ぼすインスリンの影響を内皮の有無により比較した成績を表3，図5に示した．高Kの最大収縮は，内皮温存標本では100%に対して剥離標本では 106.5±2.3% と内皮剥離標本で有意に大であった ($p<0.05$). 内皮温存標本ではインスリン 1mU/ml では高K収縮に有意な変化はなかったが，40mU/ml では 10mM と 20mM にて有意な抑制がみられた (それぞれ $p<0.05$). さらにインスリン 100mU/ml では，10mM から 30mM において有意な高K収縮の抑制がみられた (それぞれ $p<0.05$). 内皮剥離標本では，インスリン 1mU/ml, 40mU/ml では高K収縮に有意な変化はなかったが，100mU/ml では高 K 10mM の収縮が有意に抑制された ($p<0.05$). pD_2値は，内皮温存標本において，インスリン非投与時 1.65±0.01 からインスリン 100mU/ml で 1.63±0.02 ($p<0.05$) と有意な低下がみられ (表4)，高Kの用量－反応曲線は右方に偏位した．内皮剥離標本での pD_2 値は，インスリン非投与時 1.67±0.02 に対して，いずれのインスリン濃度においても有意な変化はみられなかった (表4). 内皮の有無による比較では，インスリン 100mU/ml 投与により 10mM, 40mM では差はなかったが，20mM と 30mM で高K収縮のインスリンによる抑制の程度は内皮剥離標本が内皮温存標本に比べ有意に低下していた (それぞれ $p<0.05$, 図 8C).

Ⅱ．インスリンの血管作用に対するアスピリン投与の影響

5HT の収縮反応では，アスピリン前投与後の収縮はアスピリン非投与時の収縮と比較していずれの濃度でも有意差はなかった．アスピリンのみの前投与に比較して，アスピリンとインスリン 100mU/ml の前投与では 5HT の 5×10^{-9}M から 5×10^{-7}M の収縮が有意に抑制された (2×10^{-8}M, $p<0.01$; 5×10^{-9}M, 10^{-7}M, 5×10^{-7}M, $p<0.05$, 図 6A). pD_2値はアスピリン前投与 7.02±0.03 に対してインスリン追加投与では

Table 4. Effects of insulin on pD_2 values for 5HT, NE and potassium in strips with and without endothelium

Treatment	Presence of endothelium	pD_2 values ($\bar{x}$ ±SEM, n=15)			
		Control	Insulin (mU/ml)		
			1	40	100
5HT	+	7.03±0.02	7.04±0.03	6.96±0.03*	6.90±0.03†
	−	7.06±0.03	7.06±0.03	7.04±0.03	6.99±0.03*
NE	+	7.54±0.02	7.52±0.03	7.48±0.03*	7.47±0.03*
	−	7.60±0.02	7.59±0.03	7.58±0.02	7.57±0.03
Potassium	+	1.65±0.01	1.65±0.02	1.65±0.02	1.63±0.02*
	−	1.67±0.02	1.66±0.02	1.66±0.02	1.66±0.02

5HT, serotonin ; NE, norepinephrine.
*, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin.

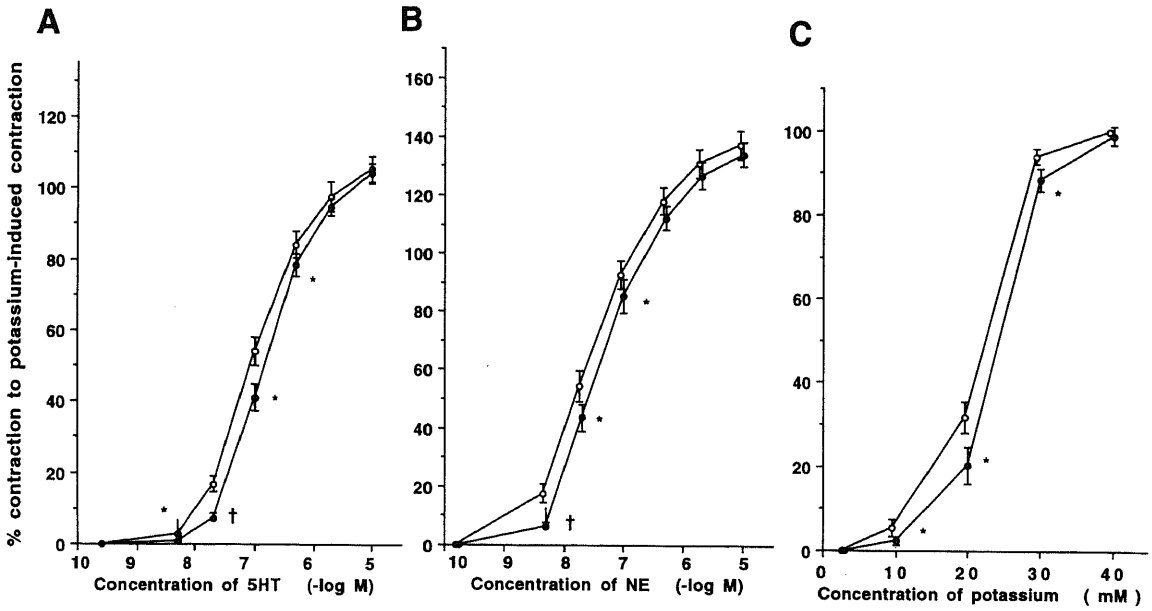

Fig. 6. Effects of insulin (100 mU/ml) on 5HT-(A), NE-(B) and potassium-(C) induced contractions in strips with pretreatment of aspirin (10^{-5}M). Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 10 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin. 5HT, serotonin; NE, norepinephrine.

Table 5. Effects of insulin on pD_2 values for 5HT, NE and potassium in strips with pretreatment of aspirin

Treatment	pD_2 values ($\bar{x}$±SEM, n=10)	
	Control	Insulin (100mU/ml)
5HT	7.02±0.03	6.91±0.04†
NE	7.54±0.04	7.46±0.03*
Potassium	1.65±0.02	1.63±0.01*

5HT, serotonin; NE, norepinephrine.
*, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between aspirin and aspirin +insulin.

Table 6. Effects of insulin on pD_2 values for 5HT, NE and potassium in strips with pretreatment of L-NAME

Treatment	pD_2 values ($\bar{x}$±SEM, n=10)	
	Control	Insulin (100mU/ml)
5HT	7.007±0.03	7.02±0.02
NE	7.59±0.04	7.52±0.03
Potassium	1.66±0.03	1.65±0.02

5HT, serotonin; NE, norepinephrine; L-NAME, N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester.

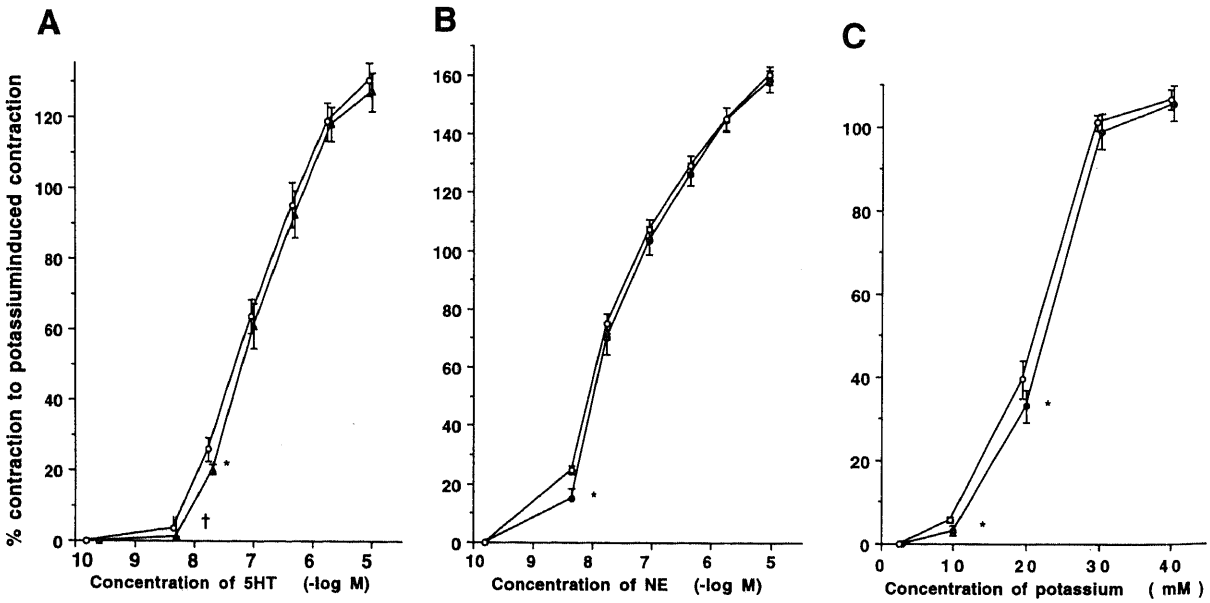

Fig. 7. Effects of insulin (100 mU/ml) on 5HT-(A), NE-(B) and potassium-(C) induced contractions in strips with pretreatment of N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester (10^{-4}M). Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 10 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin. 5HT, serotonin; NE, norepinephrine.

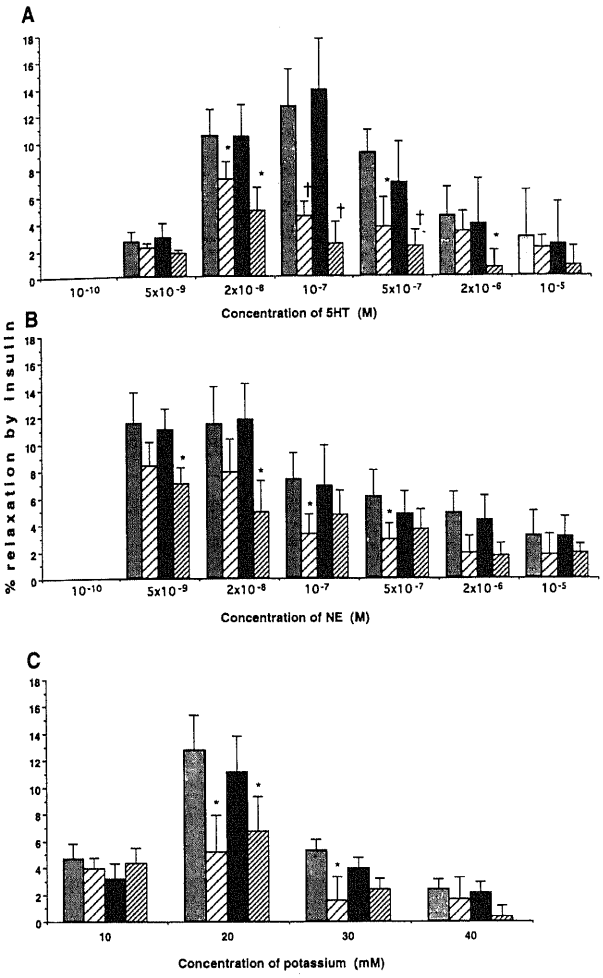

Fig. 8. Effects of endothelium, aspirin, or L-NAME on insulin-evoked decrease in contraction to 5HT, NE and potassium. ▩, strips with endothelium; ▨, strips without endothelium; ■, strips with pretreatment of aspirin; ▨, strips with pretreatment of L-NAME. Contraction induced by 40 mM potassium was taken as 100%. Results are expressed as mean±SEM. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ compared to strips with endothelium. L-NAME, N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester; 5HT, serotonin; NE, norepinephrine.

6.91±0.04 とインスリンにより有意に低下し ($p<0.01$, 表5), 5HT の用量－反応曲線は右方に偏位した．インスリン 100mU/ml による 5HT 収縮抑制の程度は，アスピリン非投与時と比較してアスピリンの前投与後もいずれの濃度においても有意差はなかった (図 8A). NE の収縮反応では，アスピリン前投与による収縮反応の変化はみられなかった．しかしインスリンの前投与により NE の 5×10^{-9}M から 10^{-7}M の収縮が有意に抑制された (5×10^{-9}M, $p<0.01$; 2×10^{-8}M, 10^{-7}M, $p<0.05$, 図 6B). pD_2値はアスピリン前投与 7.54±0.04 に対してインスリン追加投与では 7.46±0.03 とインスリンにより有意に低下し ($p<0.05$, 表5), NE の用量－反応曲線は右方に偏位した．NE 収縮のインスリン 100mU/ml による収縮抑制の程度は，アスピリン前投与により NE のいずれの濃度においても有意な変化はなかった (図 8B). 同様に高Kの収縮反応でも，アスピリン前投与による収縮反応の変化はみられなかった．しかしインスリンの前投与にて高Kの 10mM, 20mM, 30mM の収縮が有意に抑制された (それぞれ $p<0.05$, 図 6C). pD_2値はアスピリン前投与 1.65±0.02 に対してインスリン追加投与により 1.63±0.01 と有意に低下し ($p<0.05$, 表5), 高Kの用量－反応曲線は右方に偏位した．インスリン 100mU/ml によるK収縮抑制の程度も，アスピリン前投与によりKのいずれの濃度においても有意な変化はなかった (図 8C).

Ⅲ．インスリンの血管作用に対する L-NAME 投与の影響

5HT の収縮は，L-NAME の前投与により有意な収縮反応の亢進がみられた．L-NAME のみの前投与に比較して，L-NAME とインスリン 100mU/ml の前投与により 5HT の 5×10^{-9}M と 2×10^{-8}M の収縮が有意に抑制されたが (それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$, 図 7A), pD_2 値には差はなかった (表 6). 5HT の収縮反応に及ぼすインスリンの抑制効果に対する L-NAME の影響を図 8A に示す．L-NAME 前投与により 2×10^{-8}M から 2×10^{-6}M の 5HT 収縮に対するインスリンによる収縮抑制が有意に減少した (10^{-7}M, 5×10^{-7}M, $p<0.01$; 2×10^{-8}M, 2×10^{-6}M, $p<0.05$). NE の収縮は，L-NAME 投与により有意な収縮反応の亢進がみられた．L-NAME のみの前投与に比較して，L-NAME とインスリンの前投与により NE の

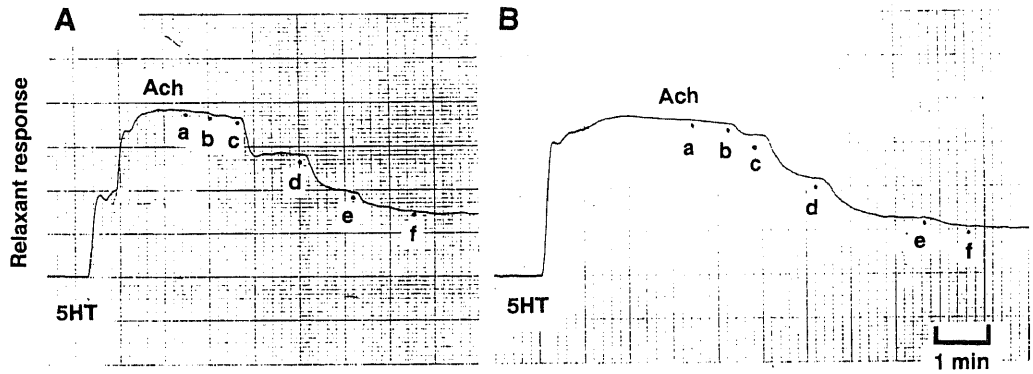

Fig. 9. Experimental records showing effects of insulin on vasodilative responses to Ach in the isolated femoral artery with endothelium. (A) Control strips. (B) Strips with insulin (100 mU/ml) pretreatment 20 min before the addition of 5HT (ED_{50}). Ach was added directly to the bath at dotted marks (a～f) during 5HT-induced contraction. The concentrations of Ach in the bath were 5×10^{-9}M (a), 2×10^{-8}M (b), 10^{-7}M (c), 5×10^{-7}M (d), 2×10^{-6}M (e) and 10^{-5}M (f). Ach, acetylcholine; 5HT, serotonin.

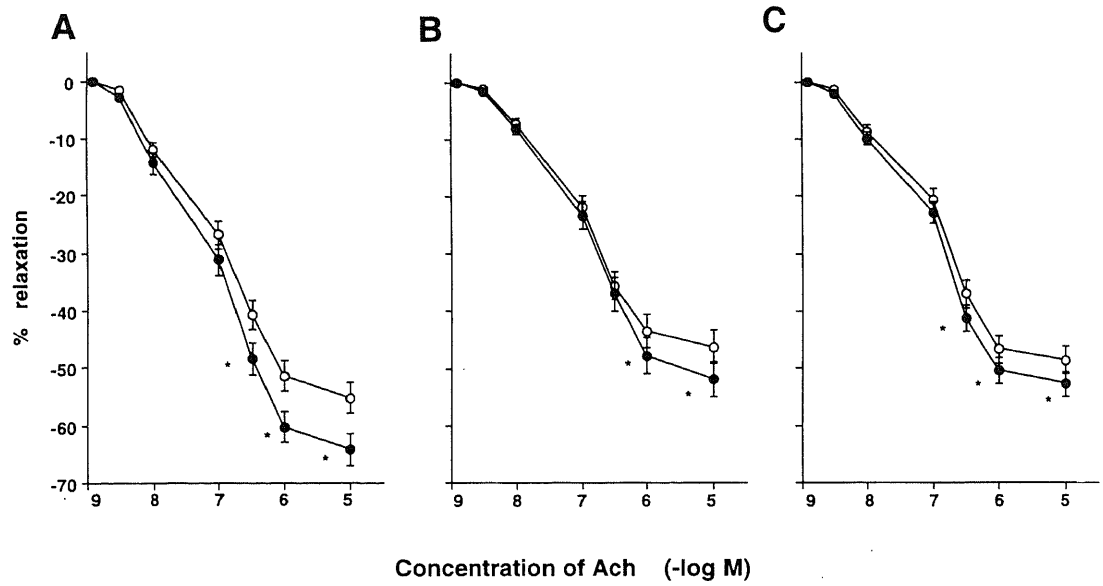

Fig. 10. Effects of insulin (100 mU/ml) on Ach-induced relaxation. Precontractions were induced by serotonin (A), norepinephrine (B) and potassium (C) with ED_{50} were taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 15 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ compared to relaxation induced by Ach without insulin. Ach, acetylcholine.

Table 7. Effects of insulin on pD_2 values for Ach in strips with pre-constriction of 5HT, NE and potassium (ED_{50})

Treatment	pD_2 values ($\bar{x}$ ±SEM, n=15)	
	Control	Insulin (100mU/ml)
5HT	7.00±0.05	7.21±0.05†
NE	7.01±0.03	7.09±0.03*
Potassium	6.95±0.02	7.00±0.02*

Ach, acetylcholine; 5HT, serotonin; NE, norepinephrine; ED_{50}, median effective dose.
*, $p<0.05$; †, $p<0.01$ between control and insulin.

Table 8. Effects of insulin on pD_2 values for SP in strips with pre-constriction of 5HT, NE and potassium (ED_{50})

Treatment	pD_2 values ($\bar{x}$ ±SEM, n=15)	
	Control	Insulin (100mU/ml)
5HT	7.08±0.01	7.12±0.01*
NE	7.01±0.02	7.08±0.03*
Potassium	7.04±0.01	7.08±0.03*

SP, substance P; 5HT, serotonin; NE, norepinephrine; ED_{50}, median effective dose.
*, $p<0.05$ between control and insulin.

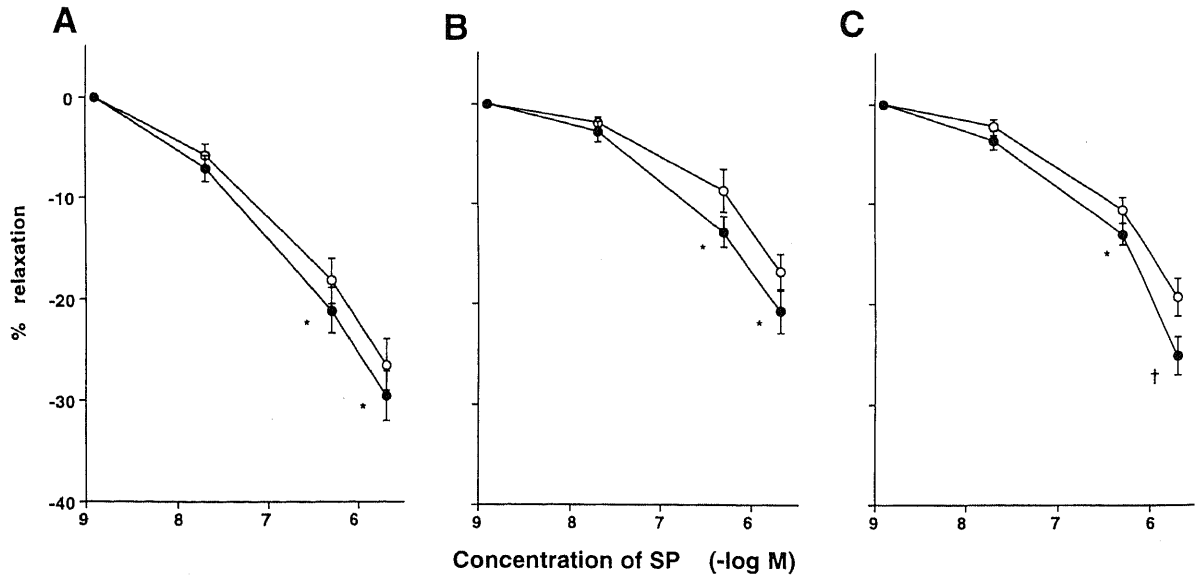

Fig. 11. Effects of insulin (100 mU/ml) on SP-induced relaxation. Precontractions were induced by serotonin (A), norepinephrine (B) and potassium (C) with ED_{50} were taken as 100%. Each point on the curves represents the mean of 15 experiments; vertical bars indicate±SEM. ○, control; ●, insulin. *, $p<0.05$; †, $p<0.01$ compared to relaxation induced by SP without insulin. SP, substance P.

5×10^{-9}M の収縮が有意に抑制されたが ($p<0.05$, 図 7B), pD_2 値には差はなかった (表 6). NE の収縮反応に及ぼすインスリン 100mU/ml の抑制効果の L-NAME 前投与の有無による比較では, L-NAME 前投与により NE の 5×10^{-9}M と 2×10^{-8}M において有意な収縮抑制の減少がみられた (それぞれ $p<0.05$; 図 8B). 同様に高Kの収縮も, L-NAME 投与により有意な収縮反応の亢進がみられた. L-NAME のみの前投与に比較し, L-NAME とインスリンの前投与により高Kの 10mM と 20mM の収縮において有意な抑制がみられが ($p<0.05$, 図 7C), pD_2 値には差はなかった (表 6). 高Kの収縮反応に及ぼすインスリン 100mU/ml の抑制効果の L-NAME 前投与の有無による比較では, L-NAME 前投与によりKの 20mM において有意な収縮抑制の減少がみられた ($p<0.05$, 図 8C).

Ⅳ. Ach および SP の内皮依存性血管拡張反応に及ぼすインスリンの影響

1. Ach の内皮依存性血管拡張反応に及ぼすインスリンの影響

図 9 に ED_{50} での 5HT の前収縮のもとでの Ach の内皮依存性血管拡張反応のインスリン 100mU/ml の投与前後での実例を示した. ED_{50} での 5HT の前収縮のもとでの Ach の内皮依存性血管拡張反応は, インスリン 100mU/ml の投与により Ach の 5×10^{-7}M から 10^{-5}M で有意に増加した (それぞれ $p<0.05$, 図 10A). pD_2 値は, インスリン非投与 7.00±0.05 に対してインスリン投与では 7.21±0.05 と有意に大きく ($p<0.01$, 表 7), Ach の用量－反応曲線は左方に偏位した. ED_{50} での NE の前収縮のもとでは, インスリンの投与により Ach 2×10^{-6}M, 10^{-5}M の血管拡張反応が有意に増加した (それぞれ $p<0.05$, 図 10B). pD_2 値は, インスリン非投与 7.01±0.03 に対してインスリン投与では 7.09±0.03 と有意に大きく ($p<0.05$, 表 7), Ach の用量－反応曲線は左方に偏位した. 同様に ED_{50} での高Kの前収縮のもとでも, インスリンの投与により Ach 5×10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M での血管拡張反応が有意に増加した (それぞれ $p<0.05$, 図 10C). pD_2 値は, インスリン非投与 6.95±0.02 に対してインスリン投与では 7.00±0.02 と有意に大きく ($p<0.05$, 表 7), Ach の用量－反応曲線は左方に偏位した.

2. SP の内皮依存性拡張反応に及ぼすインスリンの影響

ED_{50} での 5HT の前収縮のもとでの SP の内皮依存性血管拡張反応は, インスリン 100mU/ml の投与により SP の 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M にて有意に増加した (それぞれ $p<0.05$, 図 11A). pD_2 値は, インスリン非投与 7.08±0.01 に対してインスリン投与では 7.12±0.01 と有意な増加がみられ ($p<0.05$, 表 8), SP の用量－反応曲線は左方に偏位した. ED_{50} の NE の前収縮のもとでの SP の内皮依存性血管拡張反応は, インスリンの投与により, SP の 5×10^{-7}M, 2×10^{-6}M にて有意に増加した (それぞれ $p<0.05$, 図 11B). pD_2 値は, インスリン非投与 7.01±0.02 に対してインスリン投与では, 7.08±0.03 と有意に大きく ($p<0.05$, 表 8), SP の用量－反応曲線は左方に偏位した. 同様に ED_{50} の高Kの前収縮のもとでの SP の拡張反応も, インスリンの投与により, SP の 5×10^{-7}M ($p<0.05$), 2×10^{-6}M ($p<0.01$) にて有意な増加がみられた (図 11C). pD_2 値は, インスリン非投与 7.04±0.01 に対してインスリン投与では 7.08±0.03 と有意に大きく ($p<0.05$, 表 8), SP の用量－反応曲線は左方に偏位した.

考　　察

インスリンの心血管作用は, 古くから低血糖時の変化として知られており, 低血糖時の前腕血流量の増加が報告されている[26]. インスリンが低血糖のない状態においても心血管作用を有することは, インスリンの副作用として最初に報告された[1]. すなわち高度の自律神経障害を伴った糖尿病患者ではインスリンにより低血糖のない状態で, 低血糖類似の症状や起立性低血圧の増悪がみられ, その成因としてインスリンによる直接の血管拡張反応が関与している可能性が示された[27]. Takata ら[28] は, ストレンゲージプレチスモグラフを用い末梢循環に及ぼすインスリンの影響を検討した. その結果, 自律神経障害を伴った糖尿病患者では低血糖のない状態でインスリンにより血圧が低下し, 同時に末梢血管抵抗の低下と静脈容量, 静脈伸展性の増加がみられることから, インスリンが動脈と静脈のいずれに対しても血管拡張作用を有することを示した. 動物実験においても, インスリンが冠動脈[29] や骨格筋血管[11] に対して血管拡張作用を示すことが報告されている.

一方, 近年肥満を伴った高血圧症では, インスリン抵抗性, 高インスリン血症がみられ, 肥満のない本態性高血圧症や高血圧の家族歴を有する正常血圧者でも高頻度にインスリン抵抗性を示すことが報告された[4,5]. これらの疫学的調査から, 高インスリン血症が本態性高血圧発症の成因の一つとなる可能性が想定され, いわゆるインスリン仮説として注目されている[5]. インスリンの昇圧機序としては, 腎臓の尿細管におけるナトリウム再吸収の促進[7] と交感神経活動刺激[8,9] が明らかにされている. しかしヒトやイヌにおいてはインスリン投与により昇圧しないとの成績が報告され[11,12], これはインスリンの持つもう一つの重要な心血管作用である血管拡張作用により, 昇圧機序が相殺されたためと考えられている[13]. しかし, 肥満を伴った高血圧患者ではインスリンに対する血管拡張反応に障害がみられることが報告され, 遺伝的あるいは環境的に規定された血管反応の差が昇圧に関与する可能性が示唆されている[4~6]. このようにインスリンの血管拡張反応とその障害は, 本態性高血圧の成因を考えるうえで極めて重要な臨床上の問題となっているが, その機序については一定の見解は得られていない.

動物実験において, インスリンがラットの尾の抵抗血管の NE に対する血管収縮反応を減弱させること[30] や, 家兎動脈・静脈の NE とアンギオテンシンⅡに対する血管収縮反応を減弱させること[31] が報告されている. これらの報告は, インスリンの血管拡張作用が体内の昇圧物質に対する血管反応性を抑制することにあることを示唆している. 一方血管の内皮細胞には, インスリンに高親和性を有する特異な受容体が存在し, その受容体の数は血管平滑筋細胞の受容体より10倍程度多く, さらに大血管および細小血管といった血管部位の違いによる内皮細胞上でのインスリン受容体数には差のないことが報告されている[32]. また, EDRF のほかにもエンドセリン[33], トロンボキサン A_2 (thromboxane A_2, TXA_2)[23], PGI_2[22], 内皮由来過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)[34,35] などの内皮から放出され血管平滑筋の収縮弛緩現象を調節する種々の物質や因子が報告されている. 血管トーヌスの制御が, こうした内皮由来の種々の因子を介した収縮弛緩の均衡からなっていることが, 明らかとなってきている. したがって血管作動物質の作用機序を考える上で, 内皮機能の関与を検討することは不

可欠と思われる．しかしながらインスリンの血管作用を内皮細胞を介した作用と中膜平滑筋への直接作用とに分けて検討した報告はなく，今回の検討を行った．

今回の検討では，インスリンは内皮剥離標本において，収縮物質に関わらず非特異的な血管拡張作用を示した．したがってインスリンは血管平滑筋に直接作用し血管拡張を起こし，その反応は特定の受容体を選択的に抑制するものではなかった．さらに内皮温存標本において，インスリンは非特異的な血管収縮反応の抑制を示し，その抑制効果は内皮剥離標本より大であった．また，その作用はアスピリンの前投与では影響なく，L-NAME で抑制され，さらに Ach や SP による内皮依存性血管拡張反応を増強した．これらの成績からは，インスリンは平滑筋に対し直接血管拡張作用を示すとともに，血管内皮に作用し NO の産生や放出を促進する作用を有することが示唆された．

インスリンの血管拡張作用の機序は明らかではないが，これまで全身的および局所的にいくつかの機序が提案されている．全身的機序として，Allwood ら[36]は低血糖時の皮膚血管において交感神経系を介した血管拡張を示している．またインスリンの血管拡張作用が β 交感神経遮断薬であるプロプラノロールにて抑制されたことから，局所的な β 交感神経刺激作用が報告されている[11][14]．しかし，インスリンによる血管拡張作用は血中エピネフリンの上昇がなくてもみられ，グルコースクランプ法を用いたヒトの正常血糖高インスリン血症において骨格筋血流の増加が，プロプラノロールやアトロピンの投与によっても低下しないことが報告[37]されており，インスリンの血管拡張作用に β 交感神経やコリン作動性神経の関与は少ないものと思われる．またインスリンによる骨格筋酸素消費量の増大に伴う代謝性の血管拡張も考えられるが，糖の取り込みや乳酸の排出の増加がみられる少量のインスリン動脈内投与では局所的な血管拡張を認めなかったことが報告されている[17]．局所的な血管拡張機序には，受容体での拮抗[31][38]のほかに，Na^+, K^+-ATPase の促進による膜の過分極[15]，電位および受容体作働性の細胞外 Ca^{2+} 流入の抑制や細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出抑制，または Ca^{2+}-ATPase 促進による細胞内 Ca^{2+} の排出促進などがあげられる[16]．受容体での拮抗に関しては，今回の成績は，5HT, NE および高Kのどの血管作動物質の収縮反応も抑制しており，特定の受容体を選択的に抑制するものではないとする報告に一致する[31][38]．インスリンが多くの組織において過分極を起こすことが知られている[39]．血管平滑筋に関しても糖代謝を介さず，Na^+, K^+-ATPase を刺激し，Na^+-K^+ ポンプが活性化し過分極をおこし，血管平滑筋が弛緩することが示されている[15]．Ca^{2+} 交換に対してインスリンは種々の作用を有し，インスリンが受容体依存性および電位依存性 Ca^{2+} チャンネルに作用し Ca^{2+} の流入を減少させ，細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を抑制し，さらに細胞膜の Ca^{2+}-ATPase を刺激し Ca^{2+} の放出を増大させ，これらの作用により細胞内 Ca^{2+} は低下し血管平滑筋を弛緩させる[16][40]．今回の内皮剥離標本におけるインスリンの影響，すなわち血管平滑筋に対する直接作用の検討では，5HT, NE および高Kのいずれの収縮反応もインスリンにより抑制された．今回用いた血管収縮物質の作用機序としては，5HT の収縮は大動脈では細胞内 Ca^{2+} 放出によって発生すると考えられている[41]．NE の収縮は，ウサギ大動脈では膜電位変化をほとんど伴わないにも関わらずこの間に Ca^{2+} 流入の増加がみられ，電位依存性 Ca^{2+} チャンネルとは異なった性格を持つ受容体制御 Ca^{2+} チャネルと，細胞内貯蔵 Ca^{2+} の放出によって発生するとされている[42]．高Kの収縮は，血管平滑筋が脱分極し，Ca^{2+}を含むすべてのイオンの透過性が増加するためである[43]．したがって，今回の成績からは，インスリンによる血管収縮抑制様式は，細胞内遊離 Ca^{2+} の抑制や膜脱分極の抑制などいずれかに特異的なものではないと思われる．

一方，インスリンは内皮を介する血管収縮，弛緩に影響する可能性がある．内皮細胞による血管作用を考える場合には，PG, EDRF やその他の内皮由来の収縮および拡張因子の関与を考慮する必要がある．このうち PG は生体内のほとんどの組織で産生されるオータコイドである．生体内には約20種のプロスタノイドが存在することが知られているが，このうち PGI_2 は強い平滑筋弛緩作用[22]をもち，TXA_2は強い血管収縮作用[23]を示し，この相反する作用をもった2つの物質が，血管の収縮弛緩現象の調節に重要な役割を演じている．生体内におけるインスリンと PG の関係については，PG の前駆体であるアラキドン酸が膵臓の β 細胞からのインスリン分泌を刺激することが報告され[44]，腎のメサンギウム細胞においてインスリンは PG の産生に関与していることが示されている[45]．すなわち PG とインスリンは体内において相互に影響し合っており，インスリンの血管作用においても PG を介する作用が関与している可能性がある．しかし，今回の検討では，シクロキシゲナーゼ活性を完全に阻害する量のアスピリンの前投与[46]によっても，5HT, NE, 高Kのいずれの収縮反応に変化はなく，またインスリン 100mU/ml の投与による収縮抑制程度にも影響はみられなかった．したがって，ウサギ大腿動脈ではインスリンの血管拡張作用に PG の関与はないと思われる．ラットの大動脈においても同様の結果が報告されている[47]．これに対してヒトの臍帯静脈内皮細胞の培養系でインスリンが PGI_2 の産生を抑制したとする報告[48]や，豚冠動脈において TXA_2 誘発収縮が増強されたとする報告がみられる[49]．こうした成績の相違の理由としては種差や血管床の違いが考えられるが，この点に関する検討はなく今後さらに種々の動物，血管床におけるインスリンと PG の関連性の検討が必要と思われる．

PG 以外の内皮由来の血管拡張および収縮因子としては，これまで拡張因子として EDRF[20]と EDHF[34][35]，収縮因子としてエンドセリン[33]が知られている．血管拡張作用には拡張因子の増加あるいは収縮因子の減少が考えられる．EDRF の本体は NO であり，その合成は L-アルギニンのグアニジノ基にある窒素原子に由来することが明らかにされている[21]．NO は，血管平滑筋の可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し，cGMP の合成を増加させる[50]．cGMP は，Ca^{2+} ポンプの活性化や Ca^{2+} チャネルの抑制により細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させ[51]，血管を弛緩させる．一方，L-アルギニンの誘導体である L-ニトロアルギニン (L-NAMEやN^G-monomethyl-L-arginine など) は NO の合成阻害作用を有し，これらの化学物質は EDRF の産生を抑制するための手段として実験に用いられている[24]．今回の成績では，L-NAME の投与によりインスリンの血管拡張作用が抑制され，さらにインスリンにより Ach および SP の内皮依存性拡張反応の増強作用がみられた．これらの成績は，インスリンの血管拡張作用にはインスリンによる NO 産生および放出の増加が関与していることを示している．動物実験ではラットの摘出大動脈リング標本において，内皮存在下でインスリンはバゾプレッ

ンや NE の収縮を抑制し，L-ニトロアルギニンがこの作用を減弱させることより NO の産生が関与していることが報告されている[38)47)]．ヒトにおいても上下肢の動脈への生理的濃度のインスリン投与による血流増加が L-ニトロアルギニンの投与により低下することから，インスリンの血管拡張作用が NO の放出を刺激して起こることが報告されており[18)19)]，今回の成績と一致する．EDRF の放出を起こす血管作動物質としては Ach と SP のほかに ATP やブラジキニンなどが知られているが，血流に起因するずり応力によっても引き起こされる[52)]．いずれも，EDRF の放出のためには内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が必要とされる[53)]．血管内皮細胞の Ca^{2+} 動員機構としては，細胞内 Ca^{2+} 放出貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出，あるいは細胞外液からの Ca^{2+} 流入があげられる[41)42)]．内皮細胞膜には非選択性の陽イオンチャネルが存在し[54)]，このチャネルの開口により内皮細胞内へ Ca^{2+} が流入する．また Na^{+}-Ca^{2+} 交換機構の存在も示されている[55)]．さらに内皮細胞の過分極はイオン勾配により Ca^{2+} の流入を増加させる[54)]．これらの作用により内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し NO 産生が増加させる．したがってインスリンも，細胞内 Ca^{2+} 放出貯蔵部位や細胞外液からの Ca^{2+} 流入に影響を与え，内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させる可能性がある[56)]．この点に関し内皮細胞，平滑筋細胞の Ca^{2+} 動態に及ぼすインスリンの影響を検討した報告では，インスリンにより内皮細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し，平滑筋内 Ca^{2+} 濃度が減少することが示されている[47)]．すなわち，インスリンは内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度を増加させ，NO の合成および遊離を有意に増加させる作用を持つと思われる．またこの結果は，糖尿病，本態性高血圧患者および肥満患者では，アセチルコリンによる血管弛緩作用が傷害され，同時にインスリンによる骨格筋血流増加作用が減弱しているという報告とよく一致する[57)58)]．

EDHF は，Ach や伸展刺激により放出され，NO 合成阻害物質によって阻害できない物質である[34)]．血管平滑筋では K^{+} チャネルを開き，過分極を生じさせて血管拡張作用を示す．いまだその物質は明らかにされていないが，ウアバインにて抑制されることから，インスリンと同様に Na^{+}, K^{+}-ATPase を刺激して過分極をもたらす物質である可能性が指摘されている[35)]．インスリンの血管拡張作用における EDHF の役割は明かではないが，インスリンによる Ach 誘発内皮依存性血管拡張の増強作用が，正常血圧者では NO を介しているのに対して，本態性高血圧患者ではその増強作用がウアバインにより抑制されることから，血管平滑筋の過分極と関連することが報告されている[59)]．インスリンの血管拡張作用における EDHF の役割については，高血圧などの病的状態も含めさらに検討を要すると思われる．エンドセリンなどの内皮由来血管収縮因子へのインスリンの影響については，インスリンがその受容体を介してエンドセリン-1 分泌ならびに mRNA 発現を増加させるとの報告がみられる[60)61)]．しかし，生体内におけるインスリンによるエンドセリン-1 分泌促進効果に関する報告は必ずしも一定したものではなく[62)]，PG 同様動物種や血管部位の違いが関係しているものと思われる．

近年インスリン抵抗性と，それに伴う高インスリン血症が高血圧の成因の一つであるとする，いわゆるインスリン仮説が提唱された[4)~6)]．インスリン抵抗性の成因は十分明らかではないが，インスリン自体の異常[63)]，標的細胞におけるインスリン受容体の異常[64)]，細胞内での情報伝達系の異常[65)]，糖輸送坦体の異常[66)]，グリコーゲン合成酵素の異常[67)]などとともに骨格筋血流の減少[68)]が注目されている．すなわちグルコースクランプ法を用いた検討[1)2)]から，インスリンによる骨格筋血流増加と糖の取り込み促進作用が密接に関連することが明らかとなり，骨格筋血流の減少がインスリン抵抗性の一因であるとする説が示された[68)]．骨格筋血流に関しては，骨格筋自体の組成が注目されている．血圧と血管抵抗は緩徐攣縮線維 (slow-twitch fiber) の割合と負の相関を示し，急速攣縮線維 (fast-twitch fiber) の割合と正の相関がみられることが報告されている[69)]．また type Ⅱb fiber が多いほど毛細血管密度が低下しインスリン受容体に乏しいため，インスリン抵抗性を来しやすいとされる[70)]．こうした点から Julius ら[71)]は，インスリン抵抗性と高血圧は骨格筋への血流を介して互いに関連していることを提唱した．すなわち交感神経活動亢進による血管収縮や，高血圧による血管の構造変化や毛細血管密度の低下に伴う血圧低下と交感神経刺激による骨格筋筋線維の変化によりインスリン抵抗性が出現するとした．このように血管の収縮状態は，骨格筋血流やインスリン抵抗性の重要な因子であり，インスリンによる血管拡張の障害は，血管の収縮を亢進させ骨格筋血流をさらに減少させることになる．したがってなんらかの原因によりインスリンの血管拡張作用の発現に障害がみられると，インスリン抵抗性をさらに増悪させる可能性があるものと思われる．高血圧発症における高インスリン血症の役割を明らかにするためには，インスリンの血管拡張作用に障害を示す症例の病態，機序を解明することが極めて重要な問題である．今後この点に関する検討が必要と思われる．

結　　論

インスリンの内皮依存性血管拡張作用とその機序を明らかにするため，家兎摘出大腿動脈を用い 5HT, NE, 高Kの血管収縮反応に及ぼすインスリンの影響を内皮の有無により比較し，さらに，内皮温存標本においてアスピリンおよび L-NAME のインスリン作用への影響および Ach と SP による内皮依存性拡張反応に対するインスリンの作用を検討し，以下の結論を得た．

1．インスリンは，内皮剝離標本において濃度依存性に，5HT, NE，高Kの収縮を抑制した．

2．インスリンにより内皮温存標本でも収縮物質に関わらず非特異的な収縮抑制を示したが，内皮剝離標本に比べ血管収縮抑制の程度は大きかった．

3．内皮温存標本での，インスリンの血管拡張作用はアスピリン投与により変化しなかった．

4．内皮温存標本での，インスリンの血管拡張作用は L-NAME 投与により収縮物質に関わらず非特異的に抑制された．

5．インスリンにより Ach および SP の内皮依存性血管拡張反応が増強した．

以上よりインスリンの血管拡張作用は，平滑筋への直接作用とともに，NO を介した内皮依存性血管拡張作用によるものと思われた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜った恩師金沢大学医学部医学科内科学第一講座小林健一教授に深甚の謝意を表します．また終始，御

指導，御教示を戴いた金沢大学医学部保健学科高田重男教授および金沢大学第一内科循環器班の諸先生方に心から感謝いたします．なお本論文の要旨は第59回日本循環器学会総会において発表した．

文　献

1) Miles DW, Hayter CJ. The effect of intravenous insulin on the circulatory responses to tilting in normal and diabetic subjects with special reference to baroceptor reflex block and atypical hypoglycaemic reactions. Clin Sci 34 : 413-430, 1968

2) Lee JC, Dowing SE. Effects of insulin on cardiac muscle contraction and responsiveness to norepinephrine. Am J Physiol 230 : 1360-1365, 1976

3) Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. Diabetes 30 : 219-225, 1981

4) Pollare T, Lithell H, Berne C. Insulin resistance is a characteristic feature of primary hypertension independent of obesity. Metabolism 39 : 167-174, 1990

5) Ferrai P, Weidmann P, Shaw S, Giachino O, Riesen W, Allemann Y, Heynen G. Altered insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and dyslipidemia in individuals with a hypertensive parent. Am J Med 91 : 589-596, 1991

6) Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, BevilacQua S. Insulin resistance in essential hypertension. N Engl J Med 317 : 350-357, 1987

7) Gans ROB, Toorn LVD, Bilo HJG, Nauta JJP, Heine RJ, Doner AJM. Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers. Clin Sci 80 : 219-225, 1991

8) Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. Brain Res 260 : 330-333, 1983

9) Van Houten M, Posner BI. Circumventricular organs : Receptors and mediators of direct peptide hormone action on brain. Adv Metab Disord 10 : 269-289, 1983

10) Stout RW, Bierman EL, Ross R. Effect of insulin on the proliferation of cultured primate arterial smooth muscle cells. Circ Res 36 : 319-327, 1975

11) Liang C-S, Doherty JU, Faillace R, Maekawa K. Insulin infusion in conscious dogs. Effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma catecholamines. J Clin Invest 69 : 1321-1336, 1982

12) Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. J Clin Invest 87 : 2246-2252, 1991

13) Hall JE, Brands MW, Kivlighn SD, Mizelle HL, Hildebrandt DA, Gaillard CA. Chronic hyperinsulinemia and blood pressure. Interaction with catecholamines? Hypertension 15 : 519-527, 1990

14) Creager MA, Liang C-S, Coffman JD. Beta adrenergic-mediated vasodilator response to insulin in the human forearm. J Pharmacol Exp Ther 235 : 709-714, 1985

15) Ferrannini E, Taddei S, Santoro D, Natali A, Boni C, Del Chiaro D, Buzzigoli G. Independent stimulation of glucose metabolism and Na^+-K^+ exchange by insulin in the human forearm. Am J Physiol 255 : E953-E958, 1988

16) Zemel MB, Johnson BA, Ambrozy SA. Insulin-stimulated vascular relaxation. Role of Ca^{2+}-ATPase. Am J Hypertens 5 : 637-641, 1992

17) Natali A, Buzzioli G, Tadei S, Santoro D, Ceri M, Pedrinelli R, Ferrannini E. Effects of insulin on hemodynamics and metabolism in human forearm. Diabetes 39 : 490-500, 1990

18) Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Nicod P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. J Clin Invest 94 : 2511-2515, 1994

19) Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. J Clin Invest 94 : 1172-1179, 1994

20) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 28 : 373-376, 1980

21) Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature 333 : 664-666, 1988

22) Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263 : 663-665, 1976

23) Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes : A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc Nat Acad Sci USA 72 : 2994-2998, 1975

24) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43 : 109-142, 1991

25) 小池勝夫，高柳一成．用量ー作用曲線の解析ーいわゆるマグヌス装置を用いた方法ー．平滑筋の薬物反応（浦川紀元，高柳一成，砂野　哲，唐木英明編）第1版，247-259頁，文永堂，東京，1986

26) Abramson DI, Schkloven N, Margolis MN, Mirsky IA. Influence of massive doses of insulin on peripheral blood flow in man. Am J Physiol 128 : 124-132, 1939

27) Page MM, Watkins PJ. Provocation of postural hypotension by insulin in diabetic autonomic neuropathy. Diabetes 25 : 90-95, 1976

28) Takata S, Yamamoto M, Yagi S, Noto Y, Ikeda T, Hattori N. Peripheral circulatory effects of insulin in diabetes. Angiology 36 : 110-115, 1985

29) Downing SE, Lee YC, Matisoff DN. Coronary blood flow in the diabetic lamb with metabolic acidosis. Am J Physiol 238 : H263-H268, 1980

30) Alexander WD, Oake RJ. The effect of insulin on

vascular reactivity to norepinephrine. Diabetes 26 : 611-614, 1977

31) Yagi S, Takata S, Kiyokawa H, Yamamoto M, Noto Y, Ikeda T, Hattori N. Effects of insulin on vasoconstrictive responses to norepinephrine and angintensin II in rabbit femoral artery and vein. Diabetes 37 : 1064-1067, 1988

32) King GL, Buzney SM, Kahn R, Hetu N. Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. J Clin Invest 71 : 974-979, 1983

33) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 332 : 411-415, 1988

34) Komori K, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factors. Blood Vessels 27 : 238-245, 1990

35) Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. Br J Pharmacol 93 : 515-524, 1988

36) Allwood MJ, Ginsburg J. The effect of intra-arterial atropine on blood flow in the hand and forearm during insulin hypoglycaemia. J Physiol (Lond) 149 : 486-493, 1959

37) Randin D, Vollenweider P, Tappy L, Jequier E, Nicod P, Scherrer U. Effects of adrenergic and cholinergic blockade on insulin-induced stimulation of calf blood flow in humans. Am J Physiol 266 : R809-R816, 1994

38) Wu H-Y, Jeng YY, Yue C-J, Chyu K-Y, Hsueh WA, Chan TM. Endothelial-dependent vascular effects of insulin and insulin-like growth factor I in the perfused rat mesenteric artery and aortic ring. Diabetes 43 : 1027-1032, 1994

39) Zierler KL. Effect of insulin on membrane potential and potassium content of rat muscle. Am J Physiol 197 : 515-523, 1959

40) Standley PR, Zhang F, Ram JL, Zemal MB, Sowers JR. Insulin attenuates vasopressin-induced calcium transients and a voltage-dependent calcium response in rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest 88 : 1230-1236, 1991

41) Vanhoutte PM, Cohen RA, Van-Nueten JM. Serotonin and arterial vessels. J Cardiovasc Pharmacol 6 (suppl 2) : S421-S428, 1984

42) Deth R, Van Breemen C. Relative contributions of Ca^{2+} influx and cellular Ca^{2+} release during drug-induced activation of the rabbit aorta. Pflügers Arch 348 : 13-22, 1974

43) Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev 59 : 606-718, 1979

44) Band AM, Jones PM, Howell SL. The mechanism of arachidonic acid stimulated insulin secretion. Biochim Biophys Acta 1176 : 64-68, 1993

45) Kreisberg JI, Patel PI. The effects of insulin, glucose and diabetes on prostaglandin production by rat kidney glomeruli and cultured mesangial cells. Prostaglandins Leukotrienes Med 11 : 431-442, 1983

46) Mitchell JA, Akarasereenout P, Thiemerman C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc Nat Acad Sci USA 90 : 11693-11697, 1994

47) Han S-Z, Ouchi Y, Karaki H, Orimo H. Inhibitory effects of insulin on cytosolic Ca^{2+} level and contraction in the rat aorta. Endothelium-dependent and -independent mechanisms. Circ Res 77 : 673-678, 1995

48) Rosenthal RA, Ocasio VH. Insulin inhibition of endothelial prostacyclin production. J Surg Res 49 : 315-318, 1990

49) Yanagisawa-Miwa A, Ito H, Sugimoto T. Effects of insulin on vasoconstriction induced by thromboxane A_2 in porcine coronary artery. Circulation 81 : 1654-1659, 1990

50) Rapoport RM, Murad F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. Circ Res 52 : 352-357, 1983

51) Karaki H, Sato K, Ozaki H, Murakami K. Effect of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. Eur J Pharmacol 156 : 259-266, 1988

52) Dinerman JL, Lowenstein CJ, Snyder SH. Molecular mechanisms of nitric oxide regulation. Potential relevance to cardiovascular disease. Circ Res 73 : 217-222, 1993

53) Pacicca C, Von der Weid PY, Beny JL. Effect of nitro-L-arginine on endothelium-dependent hyperpolarizations and relaxations of pig coronary arteries. J Physiol (Lond) 357 : 247-256, 1992

54) Adams DJ. Ionic channels in vascular endothelial cells. Trends Cardiovasc Med 4 : 18-26, 1994

55) Sage SO, van Breemen C, Cannell MB. Sodium-calcium exchange in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. J Physiol (Lond) 440 : 569-580, 1991

56) Moore RD. Effects of insulin upon ion trasnport. Biochim Biophys Acta 737 : 1-49, 1983

57) Panza JA. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patient with essential hypertension. N Engl J Med 323 : 22-27, 1990

58) Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. J Clin Invest 85 : 1844-1852, 1990

59) Taddei S, Virdis A, Mattei P, Natali A, Ferrannini E, Salvetti A. Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. Circulation 92 : 2911-2918, 1995

60) Hu R-M, Levin ER, Pedram A, Frank HJL. Insulin stimulates production and secretion of endothelin from bovine endothelial cells. Diabetes 42 : 351-358, 1993

61) Oliver FJ, de la Rubia G, Feener EP, Lee ME, Loeken MR, Shiba T, Quertermous T, King GL. Stimulation of endothelin-1 gene expression by insulin in endothelial cells. J Biol Chem 266 : 23251-23256, 1991

62) Metsärinne K, Saijonmaa O, Yki-Jarvinen H, Fyhrquist F. Insulin increases the release of endothelin in endothelial cell cultures in vitro but not in vivo. Metabolism 43 : 878-882, 1994

63) Shoelson S, Haneda M, Blix P, Nahjo A, Sanke T,

Inouye K, Steiner D. Three mutant insulins in man. Nature 302 : 540-543, 1983
64) Flier JS. Insulin receptors and insulin resistance. Annu Rev Med. 34 : 145-160, 1983
65) Caro JF, Ittoop P, Pories WJ, Meelheim D, Flickinger EG, Thomas F, Jenquin M, Silverman JF, Khazanie PG, Sinha MK. Studies on the mechanism of insulin resistance in the liver from humans with noninsulin-dependent diabetes. Insulin action and binding in isolated hepatocytes, insulin receptor structure, and kinase activity. J Clin Invest 78 : 249-258, 1986
66) Kahn BB. Facilitative glucose transport : Regulatory mechanism and dysregulation in diabetes. J Clin Invest 89 : 1367-1374, 1992
67) Lillioja S, Bogardus C. Insulin resistance in Pima Indians. A combined effect of genetic predisposition and obesity-related skeletal muscle cell hypertrophy. Acta Med Scand 723 : 103-119, 1988
68) Baron AD, Brechtel-Hook G, Johnson A, Hardin D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. Hypertension 21 : 129-135, 1993
69) Juhlin-Dannfelt A, Frisk-Holmberg F, Karlsson J, Tesch P. Central and peripheral circulation in relation to muscle-fiber composition in normo- and hyper-tensive man. Clin Sci 56 : 335-340, 1979
70) Lillioja S, Young AA, Culter CL, Ivy JL, Abbott WGH, Zawadzki JK, Yki-Järvinen H, Christin L, Secomb TW, Bogardus C. Skeletal muscle capillary density and fiber type are possible determinants of in vivo insulin resistance in man. J Clin Invest 80 : 415-424, 1987
71) Julius S, Gudbrandsson T, Jamerson K, Shahab ST, Andersson O. The hemodynamic link between insulin resistance and hypertension. J Hypertens 9 : 983-985, 1991

Endothelial-Dependent Vasodilator Action of Insulin

Hiroaki Kiyokawa, Department of Internal Medicine (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **105**, 658—672 (1996)

Key words insulin, endothelial-dependent vasodilator action, endothelial- independent vasodilator action, isolated rabbit femoral artery

Abstract

It has been shown that insulin produces various cardiovascular effects, especially vasodilation in skeletal muscle, but exact machanisms mediating vasodilation remain obscure. The purpose of this study was to determine whether insulin has an endothelial-dependent vasodilator action, and to elucidate the mechanisms of its action. Herical strips were prepared from rabbit femoral artery, and suspended in an organ bath filled with modified Krebs solution (pH 7.4) at a temperature of 36℃. Isotonic contractions were measured. The effects of insulin at various concentrations (1 mU/ml, 40 mU/ml, 100mU/ml) on vasoconstrictions by serotonin (5HT), norepinephrine (NE), and high potassium were studied in the strips with and without endothelim. To examine whether endogenous prostaglandins and nitric oxide are involved in the inhibitory effect of insulin, the strips with endothelium were treated with 10^{-5} mol/L aspirin or 10^{-4} mol/L N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), and then 5HT, NE, and high potassium were added, followed by an additon of insulin. Futhermore, I examined the effects of insulin on endothelial-dependent vasodilation by acetylcholine (Ach) and substance P (SP) in the strips preconstricted with 5HT, NE and high K. Insulin significantly inhibited 5HT-, NE-, and high potassium-induced vasoconstrictions in both strips with and without endothelium at a concentration of 40 mU/ml or higher. However, the inhibitory effects of insulin in the strips without endothelium were significantly smaller than those in the strips with endothelium. Insulin-provoked inhibitions of 5HT-, NE-, and high potassium-induced vasoconstrictions were more weakly in the strips pretreated with L-NAME, but the pretreatment of aspirin did not affect the insulin-provoked inhibition. In the presence of predosing with insulin, the relaxing effects of Ach and SP were increased. These results suggest that insulin may produce not only endothelial-independent vasodilation, but also endothelial-dependent vasodilation.