

9436 食塩による肥厚性血管病変の修飾機構

助成研究者：東 洋 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)
 共同研究者：濱寄 秀久 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)
 和田 晶師 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)
 佐藤 潤 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)
 平川 公義 (東京医科歯科大学 医学部)
 新見 康成 (東京医科歯科大学 医学部)
 麻生 武志 (東京医科歯科大学 医学部)
 尾林 聡 (東京医科歯科大学 医学部)

内皮細胞剥離後6週間経過したウサギ総頸動脈を用いて以下に示す項目,すなわち、内皮細胞の再生状況、内膜肥厚の有無およびその程度、acetylcholine (ACh)誘発内皮依存性弛緩反応(EDR)、正常ならびに再生内皮細胞におけるL-arginine, N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA), asymmetrical N^G , N^G -dimethylarginine (ADMA)およびsymmetrical N^G , N^G -dimethylarginine (SDMA)含量について検討した。内皮細胞剥離6週後には内皮細胞の再生は完了しており、EDRの減弱と著明な内膜肥厚が観察された。再生内皮細胞においてL-NMMAならびにADMA含量は有意に増加しており、一方、L-arginine含量は有意に低下していた。SDMA含量は定量限界以下であった。ACh誘発EDRは、L-NMMAならびにADMA標品によって濃度依存的に抑制され、この抑制作用はL-arginine共存下には消失した。SDMAはACh誘発EDRに対して影響しなかった。以上の事実から、再生内皮細胞においてNO合成の内因性阻害物質が増加し、また、NO合成基質としてのL-arginine量が低下すると、内皮細胞でのEDRF/NO産生/遊離能の低下を招き、その結果、肥厚性血管病変が惹起されることが示唆された。

9436 食塩による肥厚性血管病変の修飾機構

助成研究者：東 洋 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)

共同研究者：濱岸 秀久 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)

和田 晶師 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)

佐藤 潤 (東京医科歯科大学 医用器材研究所)

平川 公義 (東京医科歯科大学 医学部)

新見 康成 (東京医科歯科大学 医学部)

麻生 武志 (東京医科歯科大学 医学部)

尾林 聡 (東京医科歯科大学 医学部)

1. 研究の目的

食塩が高血圧発症のリスクファクターの一つであることは、すでに良く知られた事実であるが、動脈硬化の発症・進展・防御過程における食塩の果たす役割については不明の部分が多い。本研究の最終目的はこの点を明らかにするとともに、食塩誘発の血管壁の機能的、器質的変化が減塩すること無しに制御可能か否かを検討することにある。

私達は、血管内膜肥厚を動脈硬化の初期病変として捉え、ウサギ頸動脈内皮細胞を剥離することによって生じる内膜肥厚モデルを作製し、内膜肥厚過程における内皮細胞の果たす役割、とりわけ内皮細胞由来血管拡張因子(EDRF/NO)による平滑筋細胞増殖抑制機構について検討して来た。その結果、内皮剥離後に再生してくる内皮細胞の機能異常、とくにEDRF/NO産生/遊離能の著明な低下が、内膜肥厚を惹起する重要な要因の一つであることを明らかにすることが出来た(1-5)。しかしながら、再生内皮細胞においてEDRF/NO産生/遊離能が低下する理由については不明であった。本年度は、この点を明らかにするために以下に示す検討を行った。

2. 研究の方法

2.1. 実験動物

実験には10週齢の日本白色在来種雄性ウサギを用いた。8週齢にて購入し、2週間の予備飼育の後実験に供した。飼育室は、温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 20\%$ に制御した。予備飼育期間中には全ての動物に普通食(RC-4、オリエンタル酵母)を与えた。

2.2 頸動脈内皮細胞の剥離

内皮細胞の剥離は既報(1-4,6-9)の方法に従って行った。すなわち、sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.)麻酔下に、頸部を正中切開し、右頸動脈を露出した。内外頸動脈分岐部より約5mm心臓寄り)を小切開(長さ約0.5mm)した。切開部より動脈

塞栓除去用バルーンカテーテル(12-40-3F, American Edward Laboratories)を挿入し、総頸動脈全域に互って内皮細胞を剥離した。バルーンには約0.15mlの空気を充満し(直径:約2.5mm)、内皮下組織にたいする損傷が可及的少なくなるよう注意した。バルーンカテーテル抜去後、切開部を10-0ナイロン糸を用いて縫合した。その際、縫合部位の狭窄を避けるよう十分な注意を払った。この操作によって内皮細胞が完全に除去された否かは、剥離術施行直後の総頸動脈内腔表面を走査型電子顕微鏡を用いて観察し、確認した。左総頸動脈には偽手術を施し、対照とした。

2.3. 電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡用標本は既報(1-9)の方法に準拠して作製した。血管内腔表面の微細構造は、走査型電子顕微鏡(ESM-3200, Elionics)を用いて観察した。

2.4. 光学顕微鏡による観察

左右頸動脈を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて固定した。エタノール系列で脱水した後、パラフィン包埋した。薄切切片を常法に従ってhematoxylin-eosinまたはelastica Van Gieson染色し、鏡検した。Image analyzerを用いて内膜ならびに中膜の面積を測定し、内膜肥厚の程度を内膜/中膜(%)として表わした。

2.5. 摘出血管標本の反応性測定

大略は既報(1-9)の方法に準拠した。すなわち、sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.)麻酔下にウサギを放血致死させ、両側総頸動脈を摘出した。附着する脂肪ならびに結合組織を除去した後、幅約2mmの輪状標本を切り取り、その一部を切開することによってtransverse stripを作製した。Transverse stripは、37°C, 95%O₂+5%CO₂飽和Krebs液(容量5ml)を満したorgan chamber内に500mgの初期張力を負荷して懸垂した。生じる張力変化はforce-displacement transducer (TB-612T)を介してペン書きoscillograph上に記録した。偽手術対照群ならびに肥厚血管標本におけるacetylcholine (ACh)誘発内皮細胞依存性弛緩反応(endothelium-dependent relaxation: EDR)の程度は、得られた濃度-弛緩曲線からE_{max}(最大弛緩%)ならびに-log EC₅₀を求めて比較した。ACh誘発EDRに及ぼすN^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), asymmetrical N^G,N^G-dimethylarginine (ADMA)およびsymmetrical N^G,N^G-dimethylarginine (SDMA)の影響についても検討した。

2.6. L-Arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA の定量

正常ならびに再生内皮細胞におけるL-arginine, L-NMMA, ADMAならびにSDMA含量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC:日本分光)を用い、Villanueva et al. (10)の

方法に準拠して定量した。すなわち、偽手術対照群ならびに肥厚頸動脈標本の内腔表面をマイクロスパーテルで軽く擦過することによって内皮細胞を集め、氷冷した5M HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 内にて超音波処理 (Sonifire 250, Branson : 20ワットにて15

Table 1 Composition and conditions of eluting buffers

Buffer	Lithium citrate (N)	pH	Elution time (min)
1	0.1	6.06	8
2	0.6	6.85	8
3	1.1	7.00	25
4	1.4	7.05	70

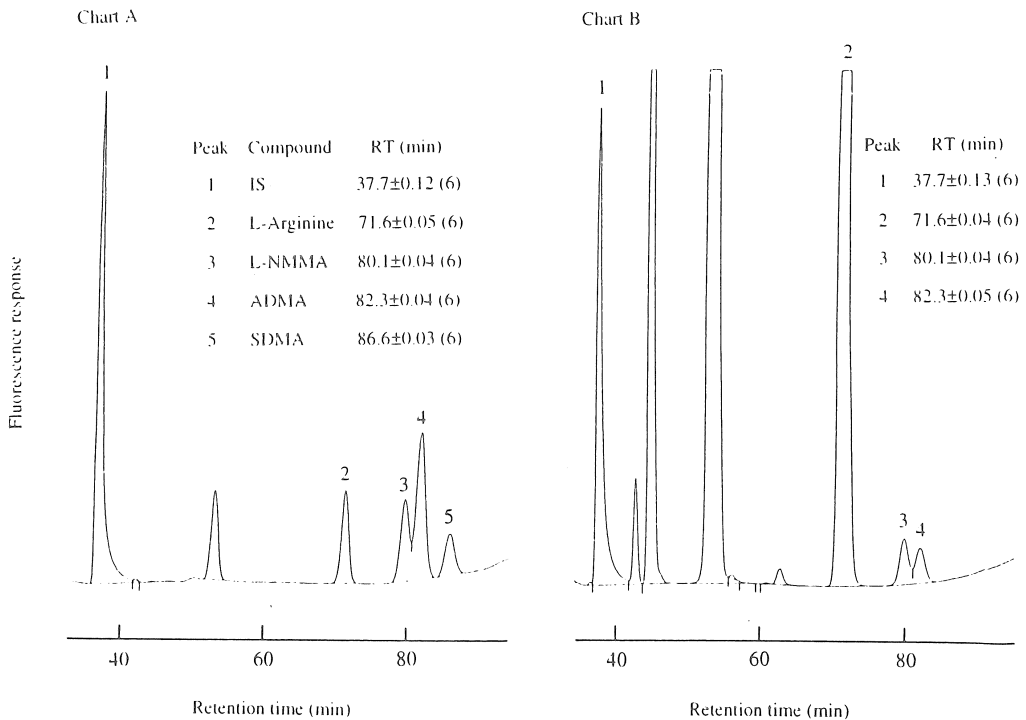


Figure 1 Chromatographic analysis of a standard mixture of L-arginine and its methylated derivatives (a) and crude extract of regenerated endothelial cells (ECs) (b). Retention time (RT) is given as mean \pm s.e.m. of 6 determinations on a mixture containing 200 pmol of each of the authentic compounds (a). Total of 6 determinations for the crude extract of the control (n=3) and regenerated ECs (n=3) were averaged (b). Paraphenylenediamine (11 nM) was used as an internal standard (IS). The column and the elution programme employed gave a good overall resolution.

秒間)した。Trichloroacetic acidを最終濃度が5%になるように添加した後、1,300gにて10分間遠心分離し、上澄をHPLC用サンプルとした。HPLCに用いた溶出液ならびに溶出時間をTable 1に示した。溶出液およびorthophthalaldehydeの流速をそれぞれ0.55および0.33ml/minとした。また、カラム(AApak Li, 6.0mmIDx100mm, 日本分光) 温度を60℃とした。L-arginine, L-NMMA, ADMAならびにSDMA標品のクロマトグラムおよび溶出時間をFig. 1-aに示した。内部標準物質にはparaphenylenediamine dihydrochlorideを用いた。各標品の濃度(Y)と内部標準物質のピーク面積に対する各標品のピーク面積の比率(X : response factor)の相関式を以下に示す。すなわち、L-arginine : $Y=59.38X-0.515$ ($r=0.9995$), L-NMMA : $Y=28.45X-0.427$ ($r=0.9996$), ADMA : $Y=71.26X-0.437$ ($r=0.9995$)およびSDMA : $Y=71.65X-0.233$ ($r=0.9998$)であった。各標品の溶出時間に対応するピークのresponse factor (X)を求め、それぞれを上式に代入することによって内皮細胞中の各化合物の濃度を求めた。

2.7 .DNA の定量

Kissane & Robins (11)の方法に準拠してDNAを微量定量した。また、Lowry法 (12)によって蛋白濃度を定量した。

3. 研究の結果

3.1 .内皮細胞の再生と内膜肥厚

走査型電子顕微鏡による観察の結果、偽手術を施したウサギの総頸動脈内腔表面は正常内皮細胞によって完全に覆われており、内皮細胞は血流方向に並列に、敷石状に配列していた。内皮細胞剥離6週後、剥離面は完全に再生内皮細胞によって覆われていた。形態は正常細胞とは異なって伸張型を呈し、異常配列していた。これら内腔表面を覆う細胞は、von Willebrand Factor を免疫染色することによって内皮細胞であると確認した。内皮細胞剥離6週後の内腔表面に分布する再生内皮細胞数($9,540 \pm 317$ cells/mm² (n=5)) は偽手術群のそれ($6,493 \pm 248$ cells/mm² (n=5))に比較して有意($p<0.005$)に増加していた。

Table 2 Neointima formation after endothelial removal of rabbit carotid artery

Treatment	n	Media (mm ²)	Intima/Media (%)
Sham operation	5	80.8 ± 4.6	4.8 ± 0.6
Endothelial removal	5	89.8 ± 8.2	38.7 ± 8.2***

Results are given as mean ± s.e.m. *** $p<0.005$. The neointima formation was estimated 6 weeks after the endothelial removal of rabbit carotid artery.

内皮細胞剥離後の内膜肥厚の結果をTable 2に示した。偽手術左総頸動脈での内膜・中膜 (%)は 4.8 ± 0.6 (n=5)であったが、内皮細胞剥離6週後には内膜は著明 ($p < 0.005$)に肥厚し 38.7 ± 8.2 % (n=5)となった。中膜の面積には両群で差は無かった。

3. 2 .ACh 誘発内皮依存性弛緩反応 (EDR)

10^{-6} M Noradrenaline (NA) 収縮下の総頸動脈transverse stripに 10^{-6} M AChを添加すると、明らかな弛緩反応が惹起された。この弛緩は、内皮細胞除去後には消失し、 10^{-5} M methylene blueならびに 10^{-4} M N^G -nitro-L-arginine前処置によって著明に減弱したが、 10^{-5} M indomethacinはこれに対して影響しなかった。これらの事実は、AChは内皮細胞由来のEDRF/NOを介して弛緩反応を惹起するが、PGI₂はこれに関与しないことを示唆する。

偽手術対照群ならびに肥厚血管のいずれにおいてもACh (10^{-9} ~ 3×10^{-5} M)は、濃度依存性の弛緩反応を惹起したが、肥厚血管での弛緩は著しく減弱していた。その結果をTable 3に示した。肥厚血管でのEmax (%)ならびに $-\log EC_{50}$ 値はいずれも偽手術群でのそれに比較して有意に小さかった。

Table 3 Comparison of the ACh-induced endothelium-dependent relaxation response

Group	n	Emax (%)	$-\log EC_{50}$
Sham operated LCA	5	72.4 ± 7.8	7.38 ± 0.07
Previously denuded RCA	5	$18.9 \pm 2.6^{***}$	$5.78 \pm 0.09^{***}$

Results are given as mean \pm s.e.m. *** $p < 0.005$. Emax : % maximum relaxation induced by acetylcholine (ACh). $-\log EC_{50}$: $-\log$ concentration of ACh producing 50% of the Emax. LCA : Left carotid artery. RCA : Right carotid artery.

3. 3 .内皮細胞における DNA, L-arginine, L-NMMA, ADMA および SDMA 含量

再生内皮細胞におけるDNA含量($176.7 \pm 4.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein)は、正常内皮細胞でのそれ($131.2 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein)に比し有意に($p < 0.005$)増加していた。従って、内皮細胞におけるL-arginine, L-NMMA, ADMAおよびSDMA含量を pmol/mg DNAで表現した。Table 4にその結果を示した。L-NMMAおよびADMA含量は再生内皮細胞において有意に増加していたが、一方、L-arginine含量は著明に減少していた。SDMA含量は定量限界以下であった。

Table 4 Comparison of L-arginine, L-NMMA, ADMA and SDMA contents in the endothelial cells (ECs)

	n	Tissue content (pmoles/mg DNA)			
		L-arginine	L-NMMA	ADMA	SDMA
Control ECs	3	47,870 ± 1,890	8.8 ± 3.0	7.0 ± 1.9	-
Regenerated ECs	3	31,470 ± 1,050***	23.5 ± 4.3*	21.2 ± 2.0**	-

Results are given as mean ± s.e.m. Significant difference vs. control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$. -: below the assay limitation by the HPLC method.

3.4 .Acetylcholine (ACh) 誘発内皮依存性弛緩反応 (EDR) に及ぼす L-NMMA, ADMA および SDMA の影響

ACh誘発EDRに対するL-NMMA, ADMAおよびSDMAの抑制作用をTable 5に示した。

Table 5 Inhibitory activity of L-NMMA, ADMA and SDMA on the acetylcholine (ACh)-induced endothelium-dependent relaxation (EDR) in the control carotid artery strips

Treatment	Concentration (M)	n	ACh-induced EDR	
			Emax (%)	-log EC50
L-NMMA	-	5	76.9 ± 4.3	7.44 ± 0.13
	3x10 ⁻⁵	5	51.6 ± 8.8*	7.05 ± 0.04*
	1x10 ⁻⁴	5	40.7 ± 5.1***	7.00 ± 0.01**
	3x10 ⁻⁴	5	34.3 ± 2.4***	6.97 ± 0.02**
ADMA	-	5	79.3 ± 3.7	7.45 ± 0.13
	3x10 ⁻⁵	5	68.2 ± 5.1	7.22 ± 0.07
	1x10 ⁻⁴	5	58.9 ± 7.3*	7.12 ± 0.06*
	3x10 ⁻⁴	5	48.0 ± 7.2***	6.98 ± 0.01***
SDMA	-	5	77.6 ± 3.7	7.45 ± 0.19
	3x10 ⁻⁴	5	77.9 ± 3.4	7.46 ± 0.21

Results are given as mean ± s.e.m. As a result of ANOVA followed by Schaffe's test, $p < 0.01$ for control vs. 10⁻⁴M L-NMMA and $p < 0.005$ for control vs. 3x10⁻⁴M L-NMMA, $p < 0.05$ for control vs. 10⁻⁴M ADMA and $p < 0.005$ for control vs. 3x10⁻⁴M ADMA. Significant difference vs. corresponding control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$, respectively (Student's *t* test). Inhibitory potency was expressed as Emax of ACh-induced EDR and -log EC50 in the absence or presence of authentic L-NMMA, ADMA or SDMA. -: No treatment with authentic compound.

L-NMMAおよびADMAはACh誘発EDRを濃度依存的に抑制した。SDMAでは最高濃度の 3×10^{-4} Mにおいてもこれに対して影響しなかった。 3×10^{-4} M L-NMMAおよび 3×10^{-4} M ADMAによるACh誘発EDRの抑制は、 3×10^{-3} M L-arginineの共存下には完全に阻止された。一方、 3×10^{-3} M D-arginineはこれに対して全く影響しなかった。

4. 考察

ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離6週間後、内皮細胞の再生は完了し、再生内皮細胞の分布密度は著明に増加していた。また、この時期には、ACh誘発EDRの著明な減少と、内膜肥厚が観察され、既に報告(1-4, 6-9)した成績と良く一致していた。ACh誘発EDRの減弱は、再生内皮細胞によるEDRF/NO産生/遊離能が低下する為であること、また、再生内皮細胞の分布密度が著明に増加しているため、細胞一個当たりのEDRF/NO産生/遊離能は正常細胞のそれに比し著しく低下することについても既に示唆した(1-4,9)。しかしながら、その理由は不明であった。本研究において、以下に示すことを明らかにすることが出来た。すなわち、再生内皮細胞におけるL-NMMAならびにADMA含量は著明に増加していたが、SDMAは正常ならびに再生内皮細胞のいずれにおいても検出限界以下であった。L-NMMAならびにADMAはその濃度に依存してACh誘発EDRを抑制し、この抑制作用はL-arginine共存下には消失した。これらの実験事実は、再生内皮細胞においてL-NMMAならびにADMAが増加する為には、ACh誘発EDRの減弱を招くことを示唆する。L-NMMAならびにADMAは、NO合成に対する内因性の阻害物質として機能していることがVallance et al.(13)によって報告されている。NO合成の基質であるL-arginine含量も再生内皮細胞において著しく減少していたので、このこともACh誘発EDR減弱の一因と考えられる。しかしながら、再生内皮細胞において検出されたL-NMMAならびにADMA含量が、NO合成を抑制するのに十分な濃度であるか否かについては更なる検討を要する。少量と言えども、正常内皮細胞内にL-NMMAならびにADMAが検出されているので、これらの内因性物質が正常状態においてもNO合成の制御に関わっているのか否かについても今後更に検討する必要がある。

EDRF/NOが、血小板の粘着や凝集を抑制(14,15)し、ひいては血小板由来増殖因子(PDGF)の放出を抑制することについては既に良く知られている。血小板機能と肥厚性血管病変発現とが密接に関連すること(16,17)、また、血管平滑筋細胞増殖に対してEDRF/NOは抑制的に作用すること(18)、EDRF/NOの産生/遊離が阻害されると、強いmitogen(19)として知られているendothelin-1の産生/放出が亢進すること(20)も報告されている。さらに私達は、EDRF/NO産生/遊離能が低下すると血管壁での

endothelin-1産生／放出が亢進し、その結果、肥厚性血管病変が惹起される可能性を示した(6,7)。これらのことを全て考え合わせると、NO生合成の内因性阻害物質が増加し、また、NO生合成基質としてのL-arginine量が低下すると、内皮細胞でのEDRF/NO産生／遊離能の低下を招き、その結果、肥厚性血管病変が惹起されることが示唆される。

5. 今後の課題

昨年度に引き続いて、内膜肥厚の発症機構について検討した。その結果、内膜肥厚形成には、EDRF/NO生合成の内因性阻害物質としてのL-NMMAならびにADMAさらにはendothelin-1などが複雑に絡み合っていることが明らかされた。これらの現象を食塩がどのように修飾するのかを今後解明する。

6. 引用文献

- (1) Azuma, H., Funayama, N., Kubota, T. & Ishikawa, M. : Regeneration of endothelial cells after balloon denudation of the rabbit carotid artery and changes in responsiveness. *Jpn. J. Pharmacol.*, 52, 541-552, (1990).
- (2) Azuma, H., Funayama, N., Kubota, T. & Ishikawa, M. : Endothelial regrowth after balloon denudation and changes in responsiveness. *Eur. J. Pharmacol.*, 183, 1281, (1990).
- (3) Azuma, H., Niimi, Y. & Hamasaki, H. : Prevention of intimal thickening after endothelial removal by a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, losartan. *Br. J. Pharmacol.*, 106, 665-671, (1992).
- (4) Niimi, Y., Azuma, H. & Hirakawa, K. : Repeated endothelial removal augments intimal thickening and attenuates EDRF release. *Am. J. Physiol.* 266 (Heart Circ. Physiol. 35), H1348-H1356, (1994).
- (5) Azuma, H., Obayashi, S., Hamasaki, H., Koyama, T. & Aso, T. : Role of endothelium in the human uterine arteries during normal menstrual cycle. *Br. J. Pharmacol.*, 114, 902-908, (1995).
- (6) Azuma, H., Hamasaki, H., Sato, J., Isotani, E., Obayashi, S. & Matsubara, O. : Different localization of ETA and ETB receptors in the hyperplastic vascular wall. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 25, 802-809, (1995).
- (7) Azuma, H., Hamasaki, H., Niimi, Y., Terada, T. & Matsubara, O. : Role of endothelin-1 in the neointima formation after endothelial removal in rabbit carotid arteries. *Am. J. Physiol.*, 267 (Heart Circ. Physiol., 36), H2259-H2267 (1994).
- (8) Azuma, H., Niimi, Y., Terada, T. & Hamasaki, H. : Accelerated endothelial regeneration and intimal hyperplasia following a repeat denudation of rabbit carotid arteries - Morphological and immunohistochemical studies-. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, in press (1995).

- (9) Azuma, H., Sato, J., Hamasaki, H., Sugimoto, A., Isotani, E. & Obayashi, S. : Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in the regenerated endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 115, in press (1995).
- (10) Villanueva, V.R., Mardon, M., Le Goff, M.Th. & Moncelon, F. : Improved high-performance liquid chromatographic analysis of methylated amino acids and related compounds and its application to the analysis of samples of polluted healthy and damaged *Picea* needles without extract purification. *J. Chromatogr.*, 393, 107-113 (1987).
- (11) Kissane, J.M. & Robins, E. : The fluorometric measurement of deoxyribonucleic acid in animal tissue with special reference to the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 233, 184-188 (1958).
- (12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).
- (13) Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J. & Moncada, S. : Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, 339, 572-575 (1992).
- (14) Azuma, H., Ishikawa, M. & Sekizaki, S. : Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol.*, 88, 411-415 (1986).
- (15) Radomski, M.W., Palmer R.M.J. & Moncada, S. : The antiaggregating properties of vascular endothelium : interaction between prostacyclin and nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.*, 92, 639-646 (1987).
- (16) Schwartz, S.M., Gajdusek, C.M. & Selden, S.C. : Vascular wall growth control : the role of the endothelium. *Arteriosclerosis*, 1, 107-171 (1981).
- (17) Ross, R. : The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N. Engl. J. Med.*, 314, 488-500 (1986).
- (18) Garg, U.C. & Hassid, A. : Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, 85, 587-590 (1989).
- (19) Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. & Marumo, F. : Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 78, 225-228 (1989).
- (20) Boulanger, C. & Luscher, T.F. : Release of endothelin from the porcine aorta, inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J. Clin. Invest.*, 85, 587-590 (1990).

REGULATORY MECHANISM BY SALT OF THE HYPERPLASTIC VASCULAR
DISEASE FOLLOWING ENDOTHELIAL REMOVAL

Hiroshi Azuma, Hidehisa Hamasaki, Masanori Wada, Jun Sato, *Kimiyoshi Hirakawa,

*Yasunari Niimi, **Takeshi Aso and **Satoshi Obayashi

Institute for Medical and Dental Engineering, Departments of *Neurosurgery, and **Obstetric
and Gynecology, Tokyo Medical and Dental University
2-3-10 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan.

Summary

We examined regeneration of endothelial cells (ECs), neointima formation, decreased endothelium-dependent relaxation (EDR) and changes in the contents of L-arginine, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), asymmetrical N^G,N^G-dimethylarginine (ADMA) and symmetrical N^G,N^G-dimethylarginine (SDMA) in the regenerated ECs, 6 weeks after balloon denudation of the rabbit carotid artery. Regeneration of ECs was completed in 6 weeks and a significant neointima formation accompanied by the decreased EDR was observed. L-NMMA and ADMA contents in the regenerated ECs (23.5 ± 4.3 and 21.2 ± 2.0 pmol/mg DNA, respectively) were significantly higher ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) than those in the control ECs (8.8 ± 3.0 and 7.4 ± 1.9 pmol/mg DNA, respectively), whereas L-arginine was significantly ($p < 0.005$) decreased in the regenerated ECs ($31,470 \pm 1,050$ pmol/mg DNA) as compared to that in the control ECs ($47,870 \pm 1,890$ pmol/mg DNA). SDMA content was below the assay limits. L-NMMA and ADMA, but not SDMA, inhibited the EDR induced by acetylcholine in a concentration-dependent manner. The inhibition with L-NMMA and ADMA was prevented by an addition of L-arginine, but not by D-arginine. These results suggest that the accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased arginine content are associated with decreased NO production/release from regenerated ECs and neointima formation.