

9540 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)

佐藤 潤 (東京医科歯科大学)

平川 公義 (東京医科歯科大学)

磯谷 栄二 (東京医科歯科大学)

麻生 武志 (東京医科歯科大学)

尾林 聡 (東京医科歯科大学)

私達は、血管内膜肥厚を動脈硬化の初期病変として捉え、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離による内膜肥厚モデルを作製した。これを用いて、内膜肥厚の発症・進展・防御過程において内皮細胞が果たす役割、とりわけ内皮細胞由来血管拡張因子(Endothelium-derived relaxing factor : EDRF/Nitric oxide : NO)ならびに強力な mitogen の一つとして良く知られている endothelin-1 (ET-1) による平滑筋細胞増殖制御機構について検討して来た。その結果、(1) EDRF/NO は血小板の粘着・凝集を抑制し、血小板由来増殖因子 (PDGF) の放出を抑制する。(2) 内皮細胞でのEDRF/NO産生/遊離能と内膜肥厚発現との間には高い負の相関関係が認められる。(3) EDRF/NO 産生/遊離能の低下に伴って血管壁での ET-1 含量が増加する。さらに、(4) NO 生合成酵素の内因性阻害物質である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) ならびにasymmetrical N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (ADMA) 含量の内皮細胞での増加と、NO 生合成基質である L-arginine 含量が減少するために内皮細胞の EDRF/NO 産生/遊離能が低下する可能性を示した。今年度は、高食塩食負荷によって内膜肥厚を始めとするこれらの変化がどのように修飾されるのかについて検討した。

その結果、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離後に誘発される内膜肥厚が、3%食塩含有飼料を12週間負荷することによって著明に抑制されるという事実を見出した。また、この抑制が、再生内皮細胞でのEDRF/NO産生/遊離能低下の抑制、血管壁でのET-1含量増加の抑制ならびにL-NMMA およびADMA 含量増加と L-arginine 含量減少の抑制と密接に関係していることが示唆された。しかしながら、高食塩食負荷によって何故このようなことが生じるのか、また、負荷する食塩量その期間などとの関係については現在のところ不明である。何れも今後の検討課題である。

9540 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：濱崎 秀久 (東京医科歯科大学)

佐藤 潤 (東京医科歯科大学)

平川 公義 (東京医科歯科大学)

磯谷 栄二 (東京医科歯科大学)

麻生 武志 (東京医科歯科大学)

尾林 聡 (東京医科歯科大学)

1. 研究の目的

私達は、血管内膜肥厚を動脈硬化の初期病変として捉え、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離による内膜肥厚モデルを作製した。これを用いて、内膜肥厚の発症・進展・防御過程において内皮細胞が果たす役割、とりわけ内皮細胞由来血管拡張因子(Endothelium-derived relaxing factor: EDRF/Nitric oxide: NO)ならびに強力な mitogen の一つとして良く知られている endothelin-1 (ET-1) による平滑筋細胞増殖制御機構について検討して来た。その結果、(1) EDRF/NO は血小板の粘着・凝集を抑制し、血小板由来増殖因子 (PDGF) の放出を抑制する。(2) 内皮細胞でのEDRF/NO産生/遊離能と内膜肥厚発現との間には高い負の相関関係が認められる。(3) EDRF/NO 産生/遊離能の低下に伴って血管壁での ET-1 含量が増加する。さらに、(4) NO 生合成酵素の内因性阻害物質である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) ならびにasymmetrical N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (ADMA) 含量の内皮細胞での増加と、NO 生合成基質である L-arginine 含量が減少するために内皮細胞の EDRF/NO 産生/遊離能が低下する可能性を示した。今年度は、高食塩食負荷によって内膜肥厚を始めとするこれらの変化がどのように修飾されるのかについて検討した。

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32羽を用いた。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。ウサギを16羽ずつのA、B2群に分け、12週間の実験期間中 A 群には普通食 (RC-4) を、B 群にはRC-4に3%食塩負荷した高食塩食 (High Salt Diet: HSD) を与えて飼育した。なお、両群とも1日100g/頭の制限給飼とした。

2.2. 総頸動脈内皮細胞の剥離

既報 (1-8) の方法に従って総頸動脈内皮細胞を剥離した。すなわち、sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.) 麻酔下に、頸部を正中切開し、左総頸動脈を露出した。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、総頸動脈全域に亘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)、内皮下組織に対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剥離されたか否かは、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。右総頸動脈には切開のみの偽手術を施し、対照とした。

2.3.平均血圧ならびに心拍数の測定

12週間の実験期間終了後、A、B 両群の平均血圧ならびに心拍数を測定し、その結果を比較した。すなわち、sodium pentobarbital (25mg/kg, i.v.) 麻酔下に一側大腿動脈を露出し、ヘパリン加生理食塩水の充満したポリエチレンチューブを挿入した。圧トランスデューサーおよび増幅器 (AP620G, 日本光電) を介してペン書きオシログラフ上に平均血圧を記録した。なお、瞬時血圧信号によって駆動した心拍計を介して心拍数を記録した。平均血圧ならびに心拍数測定後、大腿動脈から放血してウサギを致死させ両側総頸動脈を摘出した。周囲に付着した脂肪ならびに結合組織を可及的除去した後、両側総頸動脈の長さおよび湿重量を測定した。

2.4.Cyclic GMP (cGMP) 含量の測定

血管壁 cGMP 含量を、Honma (11) 等ならびにRapoport & Murad (12) の方法に準拠して定量し、その結果を A、B 両群で比較した。

2.5.L-Arginine、L-NMMA および ADMA の定量

正常ならびに再生内皮細胞におけるL-Arginine、L-NMMA および ADMA 含量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC:日本分光) を用い、既報 (7) の方法に準拠して定量した。その結果を A、B 両群で比較した。すなわち、摘出した総頸動脈標本の内腔表面をマイクロスポ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 秒間) した。Trichloroacetic acid (TCA) 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、溶出時間、溶出液および orthophthalaldehyde の流速、分離に用いたカラム (Aapak Li, 6.0mm i.d.x100mm, 日本分光) およびその温度などの測定条件はすべて前報 (7) と同じである。

2.6.DNAの定量

Kissane & Robins (9) の方法に準拠してDNAを微量定量した。また、Lowry 法 (10) によ

って蛋白濃度を定量した。

2.7. 血管壁 Immunoreactive ET-1 (ir-ET-1) 含量の測定

試料調整に先立って内皮細胞を除去しておいた血管壁での ir-ET-1 含量を既法 (4) の方法に準拠して測定し、その結果をA、B 両群で比較した。

3. 研究の結果

3.1. 体重変化およびウサギの一般状態

実験開始時、内皮細胞剥離術施行時ならびに満期での普通食投与 A 群ならびに高食塩食投与 B 群の体重変化をTable 1に示した。いずれの群においても体重推移に差はなかった。また、両群のウサギの一般状態についても差はなかった。

Table 1 Changes in body weight during the course of experiments

	n	6 weeks before denudation	At denudation	6 weeks after denudation
Control (A)	16	1.78 ± 0.03	2.35 ± 0.06	2.71 ± 0.05
HSD (B)	16	1.77 ± 0.03	2.44 ± 0.04	2.76 ± 0.04

Control (A) rabbits were given regular chow (RC-4, Oriental Yeast) and served as controls. HSD (B) rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3 % NaCl) during the 12 weeks-experimental periods (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation).

3.2. 満期における平均血圧ならびに心拍数の比較

実験満期での平均血圧ならびに心拍数を A、B 両群で比較し、その結果をTable 2に示した。高食塩食を负荷した B 群において、平均血圧は低下傾向を、また、心拍数は有意 ($p < 0.05$) に減少していた。

Table 2 Comparison of the mean blood pressure and heart rate between group A and group B

	n	Mean blood pressure (mmHg)	Heart rate (beats/min)
Control (A)	14	110.6 ± 2.4	263.3 ± 7.9
HSD (B)	15	105.0 ± 1.9	242.9 ± 4.7*

**: Significant difference vs. corresponding value in group A at $p < 0.05$. Two rabbits in control (A) and 1 rabbit in HSD (B) were eliminated from the data analysis because of the accident (abnormal accidental hemorrhage) during the measurement of blood pressure. Control (A) rabbits were given regular chow (RC-4, Oriental Yeast) and served as controls. HSD (B) rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3 % NaCl) during the 12 weeks-experimental periods (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation).*

3.3. 内膜肥厚に及ぼす食塩負荷の影響

内皮細胞剥離後に誘発される内膜肥厚に及ぼす食塩負荷の影響を、摘出総頸動脈の湿重量 (mg wet weight / 50 mm / kg body weight) ならびにDNA含量

($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)を指標として比較し、その結果をTable 3 に示した。普通食群 (A群) ならびに高食塩食群 (B群) のいずれにおいても、内皮細胞剥離 6 週後に、摘出総頸動脈の湿重量ならびにDNA含量は有意 ($p<0.005$) に増加していた。しかしながら、その増加は高食塩食負荷によって有意 ($p<0.005$) に抑制された。

Table 3 Neointimal formation after the endothelial removal and influence of high salt diet

Group	Wet weight (mg/50mm/kg)	DNA content ($\mu\text{g}/\text{mg}$ wet weight)
(1) Control (Sham operation)	24.5 \pm 0.9 (15)	3.0 \pm 0.2 (3)
(2) Control (Denudation)	38.1 \pm 1.4 (16) ^a	10.5 \pm 0.3 (3) ^a
(3) HSD (Sham operation)	23.0 \pm 0.5 (16)	2.1 \pm 0.1 (3)
(4) HSD (Denudation)	31.4 \pm 0.9 (16) ^{a,b}	6.3 \pm 0.2 (3) ^{a,b}

Control rabbits were given regular chow (RC-4) throughout the experimental period. HSD rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3% NaCl) during the 12 weeks-experimental period (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation). Right carotid artery of group (1) rabbit was abnormally missing. ^a: Significant difference at $p<0.005$ vs. corresponding value in the sham operation group. ^b: Significant difference at $p<0.005$ vs. corresponding value in the denuded control group.

3.4. 血管壁によるサイクリクGMP (cGMP) 産生

10^{-6}M Norepinephrine (NE) による収縮下のウサギ頸動脈条片に 10^{-6}M acetylcholine (ACh)を添加すると内皮依存性の弛緩反応が惹起される。この弛緩は 10^{-4}M N^{G} -nitro-L-arginine

Table 4 Comparison of cyclic GMP production in the vessel wall

Group	Net production of cyclic GMP (pmoles/mg protein)
(1) Control (Sham operation)	46.1 \pm 4.1 (4)
(2) Control (Denudation)	18.4 \pm 10.1 (4) ^a
(3) HSD (Sham operation)	86.4 \pm 18.0 (4)
(4) HSD (Denudation)	45.5 \pm 11.7 (4)

Results are given as mean \pm s.e.m. Net production of cyclic GMP was expressed as the difference between the production with 10^{-6}M norepinephrine+ 10^{-6}M acetylcholine and that with 10^{-6}M norepinephrine+ 10^{-6}M acetylcholine+ 10^{-4}M N^{G} -nitro-L-arginine. Control rabbits were given regular chow (RC-4) throughout the experimental period. HSD rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3% NaCl) during the 12 weeks-experimental period (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation). Figures in parentheses indicate the number of determinations. ^a: Significant difference at $p<0.05$ vs. corresponding value in the sham operation group.

(NOARG) の前処置によって完全に消失することを既に確認している(2,3,7)。本実験は 10^{-6}

$6\text{M NE}+10^{-6}\text{M ACh}$ 添加時と更に 10^{-4}M NOARG 共存下の cGMP 含量の差を正味の cGMP 産生量と看做して各群で比較した (Table 4)。普通食によって飼育した A 群において内皮剥離側での cGMP 正味産生量は偽手術側でのそれに比較して有意 ($p<0.05$) に低下していた。高食塩食を負荷した B 群では、内皮剥離側および偽手術側いずれにおいても cGMP 正味産生量は A 群でのそれらに比較して増加傾向を示した。また、B 群では内皮剥離側および偽手術間で cGMP 正味産生量に統計的有意差はなかった。

3.5. 内皮細胞における NO 合成酵素の内因性阻害物質

内皮細胞には、NO 生合成基質としての L-arginine の他に、NO 生合成酵素の内因性阻害物質として N^{G} -monomethyl-L-arginine (L-NMMA)、ならびに asymmetrical $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -dimethyl-L-arginine (ADMA) の 2 種が検出された。各群におけるそれぞれの含量を Table 5 に示した。普通食投与内皮細胞剥離群での L-arginine 含量は著明に減少し、一方、L-NMMA ならびに

Table 5 Contents of L-arginine, L-NMMA and ADMA in the endothelial cells

Group	L-Arginine (nmoles/mg protein)	L-NMMA (pmoles/mg protein)	ADMA (pmoles/mg protein)
(1) Control (Sham operation)	28.8±0.3	31.6±2.8	34.0±2.5
(2) Control (Denudation)	7.4±0.1 ^a	76.1±0.3 ^a	64.9±0.3 ^a
(3) HSD (Sham operation)	14.7±0.0 ^b	34.4±2.7	39.1±1.3
(4) HSD (Denudation)	12.9±0.1 ^{a,b}	48.7±1.0 ^{a,b}	38.4±1.2 ^b

Results are given as mean ± s.e.m. of 3 determinations. Control rabbits were given regular chow (RC-4) throughout the experimental period. HSD rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3% NaCl) during the 12 weeks-experimental period (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation). a: Significant difference at $p<0.005$ vs. corresponding value in the sham operation group. b: Significant difference at $p<0.005$ vs. corresponding value in the control diet group.

ADMA 含量は明らかに増加していた。高食塩食投与偽手術群での L-arginine 含量は普通食投与偽手術群でのそれに比較して有意 ($p<0.005$) に減少していたが、L-NMMA ならびに ADMA 含量には両群で差はなかった。内皮細胞剥離群での L-arginine 含量の減少と L-NMMA ならびに ADMA 含量の増加は高食塩食投与によって有意 ($p<0.005$) に抑制されていた。

3.6. 血管壁 endothelin-1 (ET-1) 含量

試料調整に先立って内皮細胞を除去しておいた血管壁での ET-1 含量に及ぼす食塩負荷の影響を Table 6 に示した。普通食投与内皮細胞剥離群での ET-1 含量は有意 ($p<0.05$) に増加していたが、高食塩食投与によってこの増加が有意 ($p<0.05$) に抑制された。偽手術群での ET-1 含量も高食塩食投与によって有意に低下していた。

Table 6 Influence of high salt diet (HSD) on the endothelin-1 (ET-1) content in the vessel wall

Group	n	ET-1 content (pmoles/g wet weight)
(1) Control (Sham operation)	3	227.3 ± 5.9
(2) Control (Denudation)	3	455.7 ± 53.0 ^a
(3) HSD (Sham operation)	3	184.7 ± 13.8 ^b
(4) HSD (Denudation)	3	253.0 ± 3.9 ^{b,c}

Results are given as mean \pm s.e.m. Control rabbits were given regular chow (RC-4) throughout the experimental period. HSD rabbits were given high salt diet (HSD: RC-4 containing 3% NaCl) during the 12 weeks-experimental period (6 weeks before to 6 weeks after the endothelial denudation). ^a and ^c: Significant difference at $p < 0.05$ and $p < 0.01$ vs. corresponding value in the sham operation group, respectively. ^b: Significant difference at $p < 0.05$ vs. corresponding value in the control diet group.

4. 考察

先に私達は、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離後に著明な内膜肥厚が惹起されることを報告した (1-8)。今回、このモデルでの肥厚性血管病変に及ぼす高食塩負荷の影響について検討した。組織学的内膜肥厚の程度と血管の湿重量増加ならびにDNA含量増加とは互いに高い相関関係を示すので、今回、血管の湿重量 (mg wet weight/50mm/kg body weight) ならびにDNA含量 (μ g/mg wet weight) を内膜肥厚の指標とした。普通食群 (A群) ならびに高食塩食群 (B群) のいずれにおいても、内皮細胞剥離6週後に、摘出総頸動脈の湿重量ならびにDNA含量は有意に増加していた。しかしながら、その増加は高食塩食負荷によって有意に抑制された。

内皮細胞でのEDRF/NO産生/遊離能の程度と内膜肥厚発現の間には高い負の相関関係が認められることを私達は既に報告した (3)。また、Garg & Hassid (13) は、内因性EDRF/NO が血管平滑筋細胞増殖に対する抑制因子として機能している可能性を指摘している。その他、EDRF/NOについては血小板凝集抑制 (14, 15) の結果に基づく血小板由来増殖因子 (PDGF) の放出抑制、強力な細胞増殖促進因子であるendothelin-1 (ET-1) (16) 産生/遊離抑制 (17) などの作用を有することが良く知られている。そこで、高食塩食負荷による内膜肥厚の抑制とこれら因子との関連性の有無について検討した。内膜剥離後の再生内皮細胞におけるEDRF/NO 産生/遊離能が著しく低下していることについては既に明らかにされており (1-3, 7, 18)、今回この点を、cGMP含量の変化として捉えることを試みた。何故ならば、内皮細胞において産生/遊離されたEDRF/NOはグアニル酸シクラーゼを活性化し、cGMP含量を増加するからである (12, 19)。Norepinephrine (NE) 誘発収縮下の頸動脈条片にacetylcholine (ACh) を添加すると、内皮依存性の弛緩反応が惹起される。その際の cGMP 産生量を測定し、比較した。その結果、内皮剥離群での cGMP 産生量は偽手術対照群でのそれに比し、有意に低下していた。また、この低下の程度は高食塩食負荷群で

は明らかに減弱していた。すなわち、内膜剥離後の再生内皮細胞におけるEDRF/NO 産生／遊離能の低下が高食塩食負荷によって抑制されることを示唆する。

NO生合成酵素に対する内因性阻害物質として N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) ならびにasymmetrical N^G, N^G -dimethyl-L-arginine (ADMA) が再生内皮細胞に分布しており、これらの阻害物質の増加とNO生合成基質であるL-arginineの減少とが再生内皮細胞によるEDRF/NO産生／遊離能の低下をもたらす要因の一つであることを報告した(7)。今回の結果もこれを裏付けるものであった。しかしながら、再生内皮細胞でのL-NMMAおよびADMA含量の増加とL-arginineの減少はいずれも高食塩食負荷によって明らかに抑制され、その結果としてEDRF/NO産生／遊離能の低下を抑制することが示唆された。

内膜剥離短時間後(24時間後)には既に血管壁でのET-1含量は著明に増加しており、6週後も軽度(約2倍)ながら有意に増加していることを既に報告した(4)。今回の6週後の検討結果も同様であった。一方、内膜剥離後のET-1含量増加は、高食塩食負荷によって抑制された。前述のように、再生内皮細胞でのL-NMMAおよびADMA含量の増加とL-arginineの減少はいずれも高食塩食負荷によって明らかに抑制され、その結果としてEDRF/NO産生／遊離能の低下を抑制することが示唆されている。また、EDRF/NOはET-1の産生／遊離抑制作用を有する(17)。従って、EDRF/NO産生／遊離能の低下が高食塩食負荷によって抑制されると、その結果としてET-1の産生／遊離が抑制される可能性が考えられる。

以上のように、高食塩食負荷による内膜肥厚の抑制とEDRF/NO産生／遊離能低下の抑制、ET-1含量増加の抑制ならびにL-NMMAおよびADMA含量増加とL-arginine含量減少の抑制はそれぞれ密接な関係を有することが示唆された。しかしながら、高食塩食負荷によって何故このようなことが生じるかについては現在のところ不明である。今後の検討課題である。

5. 今後の課題

3%食塩含有飼料を12週間負荷することによって、ウサギ総頸動脈内皮細胞剥離後に誘発される内膜肥厚が著明に抑制されるという事実を見出した。また、この抑制が、再生内皮細胞でのEDRF/NO産生／遊離能低下の抑制、血管壁でのET-1含量増加の抑制ならびにL-NMMAおよびADMA含量増加とL-arginine含量減少の抑制と密接に関係していることが示唆されたが、高食塩食負荷によって何故このようなことが生じるのか、また、負荷する食塩量その期間などとの関係については現在のところ不明である。何れも今後の検討課題である。

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., 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).

(3) 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).

(4) 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).

(5) 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).

(6) 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.*, 22, 748-754 (1995).

(7) 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, 1001-1004 (1995).

(8) Aoyagi, M., Yamamoto, M., Wakimoto, H., Azuma, H., Hirakawa, K. & Yamamoto K. : Immunohistochemical detection of Ki-67 in replicative smooth muscle cells of rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Stroke*, 26, 2328-2332 (1995).

(9) 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).

(10) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.T. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951).

(11) Honma, M., Satoh, T., Takezawa, J. & Ui, M. : An ultrasensitive method for the simultaneous determination of cyclic AMP and cyclic GMP in small-volume samples from blood and tissue. *Biochem. Med.*, 18, 257-273 (1977).

(12) Rapoport, R.M. & Murad, F. : Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.*, 52, 352-357 (1983).

(13) 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.*, 83, 1774-1777 (1989).

(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) Hirata, Y., Takagi, Y., Fukuda, Y. & Marumo, F. : Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 78, 225-228 (1989).

(17) 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).

(18) 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).

(19) Ignarro, R.J. : Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ. Res.*, 65, 1-21 (1989).

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

Hiroshi AZUMA, Hidehisa HAMASAKI, Jun SATO, *Kimiyooshi HIRAKAWA, *Eiji ISOTANI,
**Takeshi ASO and **Satoshi OBAYASHI

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

Summary

We have carried out studies to investigate the role of endothelium for the initiation, progression and prevention of the intimal hyperplasia following endothelial removal. Endothelial cells are known to produce/release endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor (EDRF/NO). Therefore, we focused on the physiological roles of endothelin-1 and EDRF/NO. we have reported that (1) EDRF/NO is an antiaggregating substance which may also modulate the release of platelet-derived growth factor, (2) there is a strong inverse correlation between the intimal hyperplasia following endothelial removal and the amount of EDRF/NO produced/released by endothelial cells, (3) endothelin-1 is involved in the neointima formation after endothelial removal and the ET_A receptors would not play a role in this process and (4) the accumulation of endogenous inhibitors (N^G-monomethyl-L-arginine: NMMA and asymmetrical N^G,N^G-dimethyl-L-arginine: ADMA) for nitric oxide synthesis and decreased L-arginine content, as a substrate for the NO biosynthesis, are associated with the decreased EDRF/NO production/release from endothelial cells and neointima formation.

The present experiments were performed to investigate the effect of chronic high salt diet on the neointimal formation following endothelial removal in connection to the changes in parameters described above. The intimal hyperplasia was attenuated in the high salt diet group which had been fed with diet containing 3% salt for 12 weeks (from 6 weeks before to 6 weeks after the endothelial removal). It was demonstrated that the attenuation of the intimal hyperplasia by the chronic high salt diet would occur in association with the restoration of the decreased production/release of EDRF/NO, the increased endothelin-1 content, the increased NMMA and ADMA content, and of the decreased content of L-arginine. However, the precise mechanism attenuating intimal hyperplasia by the high salt diet remains to be investigated.