

## イヌ脳底動脈のアセチルコリンおよびノルアドレナリンに対する内皮細胞依存性血管反応

平野 一宏

イヌ脳底動脈の *acetylcholine* (Ach) および *noradrenalin* (NA) に対する内皮細胞依存性反応に標本摘出・装着時間がどのような影響を及ぼすかを等尺性張力測定法を用いて検討した。摘出イヌ脳底動脈リング状標本を、(1) 超早期装着標本: 脳摘出5分以内・標本装着15分以内、(2) 早期装着標本: 脳摘出6~15分・標本装着16~45分、(3) 緩徐装着標本: 脳摘出16分以上・標本装着46分以上の3群に分け実験を行った。

超早期装着標本は Ach に対し明らかな内皮細胞依存性弛緩反応を示した。この内皮細胞依存性弛緩反応は、標本摘出・装着時間の延長、弛緩反応の繰り返しや10分間の *anoxia* により減弱・消失した。

平衡状態では、NA に対する収縮反応は標本摘出・装着時間が延長するにしたがい増強した。一方、収縮状態では NA に対し、低濃度では内皮細胞依存性弛緩反応を、高濃度では内皮細胞依存性収縮反応を示した。弛緩反応は反応の繰り返しにより減弱したが、標本摘出・装着時間の延長や *anoxia* による変化は認められなかった。

イヌ脳底動脈の Ach および NA に対する反応は標本摘出・装着時間の延長により収縮反応優位に変化した。したがって、イヌ脳底動脈の血管反応性を検討する際は、内皮細胞の機能を保つために慎重かつ迅速に摘出した超早期装着標本を用いるべきであると考えられた。  
(平成元年10月26日採用)

## Endothelium-Dependent Response to Acetylcholine and Noradrenalin in the Canine Basilar Artery

Kazuhiro Hirano

The effect of elapsed time for arterial specimen preparation on the endothelium-dependent response to acetylcholine (Ach) and noradrenalin (NA) was investigated by an isometric-tension recording method in the canine basilar artery. Isolated arterial rings were separated into three groups according to their brain extirpation time and preparation time; (1) super-rapidly mounted rings: the brain was extirpated within 5 minutes and prepared within 15 minutes after exsanguination, (2) rapidly mounted rings: the brain was extirpated over 5 to 15 minutes and prepared over 15 to 45 minutes after exsanguination, and (3) slowly mounted rings: the brain was extirpated over 15 minutes and prepared over 45 minutes after exsanguination.

Super-rapidly mounted rings showed an obviously dose-dependent relaxation to Ach. This relaxation response decreased as the elapsed time for specimen preparation was prolonged. The dose-dependent relaxation in super-rapidly mounted rings disappeared after removal of the endothelium. The endothelium-dependent relaxation in super-rapidly mounted rings declined with short-term (10 minutes) anoxia or repetition of relaxation.

Under equilibrated conditions, the contractile response to NA increased as the elapsed time for specimen preparation was prolonged. Under contracted conditions, the canine basilar artery showed endothelium-dependent relaxation in low doses of NA and endothelium-dependent contraction in high doses. The endothelium-dependent relaxation declined with repetition of relaxation but was not significantly changed by prolongation of the preparation time or anoxia.

These data suggest the existence of an endothelium-dependent regulation which is affected by Ach and NA in the canine basilar artery. Therefore, such arteries should be prepared in adequate time in order to investigate the response of isolated canine basilar arteries with a well functioning endothelium. (Accepted on October 26, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(4): 593-601, 1989

**Key Words** ① Acetylcholine ② Noradrenalin ③ Endothelium  
④ Endothelium-dependent response ⑤ Canine basilar artery

## I. 緒 言

Furchgott と Zawadzki の血管内皮細胞依存性弛緩反応の報告<sup>1)</sup>以来、脈管研究の新しい方向として内皮細胞機能が注目され、種々の動物・部位の血管の内皮細胞依存性反応が報告されつつある。<sup>2),3)</sup>しかし、イヌ脳底動脈の内皮細胞依存性反応は報告者により異なり、特に副交感・交感神経作動物質である acetylcholine (以下 Ach と略す) および noradrenalin (以下 NA と略す) に対する反応についてはいまだに議論の多いところである。Toda<sup>4),5)</sup> はイヌ脳底動脈の Ach による用量依存性弛緩反応を報告したが、その後イヌ脳底動脈の Ach に対する弛緩反応は認められないかあるいは他の動物にくらべ小さいとする報告<sup>6)~8)</sup> が散見され、さらに Ach に対する内皮細胞依存性収縮反応<sup>9),10)</sup> も報告されている。イヌ脳底動脈の NA に対する反応も収縮反応だけが報告されているが、その程度は報告者により異なっている。<sup>11),12)</sup>

イヌ脳底動脈は脳血管攣縮などの実験モデル

に多く用いられているが、以上のような血管反応に関する異なった報告はこのような実験結果の理解を困難にしている。本研究では、イヌ脳底動脈の Ach および NA に対する内皮細胞依存性反応と、この反応に影響を及ぼす因子を明らかにすることを目的とした。

## II. 方 法

実験材料はイヌ脳底動脈を用いた。雌雄体重 10~15 kg の雑種成犬を ketamine (10 mg/kg, i. m.) および sodium pentobarbital (30 mg/kg, i. v.) による麻酔後、気管内挿管を行い調節呼吸下に管理した。両側総頸動脈および両側大腿動脈より急速に脱血・屠殺を行い、脳を可及的速やかに摘出し、修正 Krebs 液 (NaCl 118, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 24, Na<sub>2</sub>EDTA 0.03, glucose 11.1 mM) を満たしたペトリ皿へ入れた。脳底動脈を実体顕微鏡下に剝離し、長さ 4 mm のリング状標本を 2 本作製した。1 本の標本は内腔面を 30 ゲージのステンレス棒で機械的に擦

過することにより内皮細胞を剝離した。各リングは 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> を通気した修正 Krebs 液 (37°C, pH 7.4~7.5) 30 ml を入れた臓器槽に懸垂装着した (Fig. 1)。等尺性張力は、日本光電工業 TB-612T により持続的に記録した。1.5 g の静止時張力を加え、90 分の平衡化の後実験を開始した。

血管の収縮反応を観察する場合は、平衡状態の動脈リングに NA (10<sup>-8</sup>~10<sup>-4</sup>M) を累積的に投与した。弛緩反応を観察する場合は、動脈リングをあらかじめ 3×10<sup>-6</sup>M prostaglandin

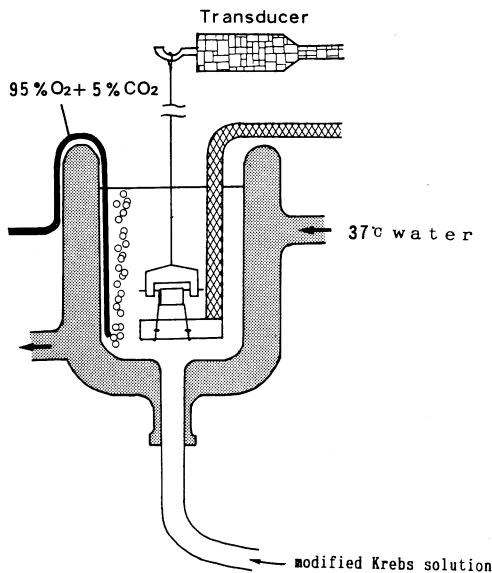


Fig. 1. Schematic representation of the experimental apparatus

**super-rapidly mounted ring**  
extirpation ≤ 5min.  
suspension ≤ 15min.

**rapidly mounted ring**  
extirpation 6~15min.  
suspension 16~45min.

**slowly mounted ring**  
extirpation ≥ 16min.  
suspension ≥ 46min.

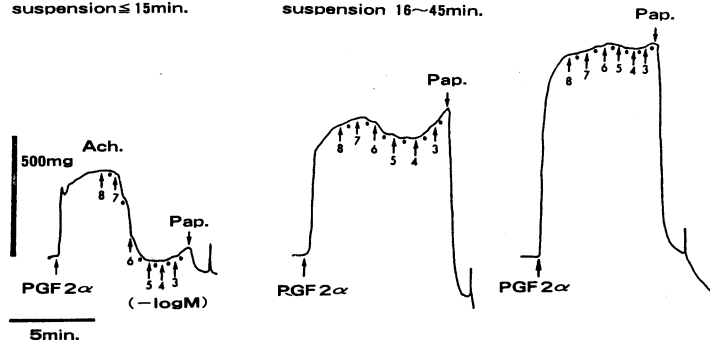


Fig. 2. Representative traces of administration of Ach in contracted canine basilar artery induced by 3×10<sup>-6</sup> M PG F<sub>2α</sub>

F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) で収縮させ、収縮が安定した時点で Ach (10<sup>-8</sup>~3×10<sup>-8</sup>M) および NA (10<sup>-8</sup>~10<sup>-4</sup>M) を累積的に投与し、その後 10<sup>-4</sup>M papaverine で最大弛緩を得た。また、各標本に 30 mM KCl を投与し得られた収縮を最大収縮とした。弛緩反応は最大弛緩に対する % relaxation, 収縮反応は最大収縮に対する % contraction で表した。薬剤を投与後は少なくとも 4 回洗浄・平衡化を行った。

動脈リング標本は、脳摘出時間と標本装着時間により以下の 3 グループに分けた; (1) 超早期装着標本: 脱血開始から脳摘出が 5 分以内, 脱血開始から標本装着が 15 分以内の標本, (2) 早期装着標本: 脱血開始から脳摘出が 6 分以上 15 分以内, 脱血から標本装着まで 16 分以上 45 分以内の標本, (3) 緩徐装着標本: 脱血開始から脳摘出まで 16 分以上, 脱血開始から標本装着まで 46 分以上の標本。

測定結果は mean±S. D. で表した。統計学的解析には Student t 検定を行い、P 値が 0.05 以下の場合、有意差ありと判定した。

### III. 結 果

#### 1. イヌ脳底動脈の Ach に対する反応について

##### ① 標本装着時間と血管反応性

イヌ脳底動脈の Ach に対する反応は脳摘出時間と標本装着時間に関係していた。超早期装着標本は、Ach に対し明らかな用量依存性弛緩反応を示した。しかし、早期装着標本ではわずかな弛緩反応が認められるのみで、緩徐装着標本では弛緩反応は認められず、一部の標本では収縮反応を示した (Fig. 2)。超早期装着標本と早期装着標本の用量反応曲線は統計学的有意差を認められた (Fig. 3)。超早期装着

標本および早期装着標本とも  $10^{-5}M$  以下の低濃度では弛緩反応を示し、 $10^{-4}M$  以上の高濃度では収縮反応を示した。

② 超早期装着標本の内皮細胞依存性弛緩反応

超早期装着標本では、Ach に対する弛緩反応は内皮細胞剥離により有意に減弱・消失した (Fig. 4)。同様に、早期装着標本において見られた Ach に対するわずかな弛緩反応も内皮細胞剥離により消失した。緩徐装着標本では Ach に対する弛緩反応は認められなかったが、内皮細胞剥離によっても有意の変化を示さなかった。

③ 弛緩反応の繰り返しによる内皮細胞依存性弛緩反応の変化

超早期装着標本の Ach に対する内皮細胞依存性弛緩反応は反応を繰り返すと減弱し、ついには消失した。すなわち、2回目の Ach の投与で弛緩反応は著明に減弱し、3回目以降の投与では弛緩反応はほとんど認められなかった (Fig. 5)。この内皮細胞依存性弛緩反応の減弱現象は Ach の最終濃度を  $10^{-5}M$  にとどめ反応を繰り返しても存在した。

④ Ach による内皮細胞依存性弛緩反応に対する anoxia の影響

超早期装着標本を 95%  $N_2$ +5%  $CO_2$  による anoxia に 10 分間暴露すると、Ach に対する弛緩反応は消失し、一部は収縮反応に逆転した。内皮細胞剥離標本では anoxia による明らかな変化は認められなかった (Fig. 6)。

2. イヌ脳底動脈の NA に対する反応について

NA に対する反応は、平衡状態と収縮状態において検討した。

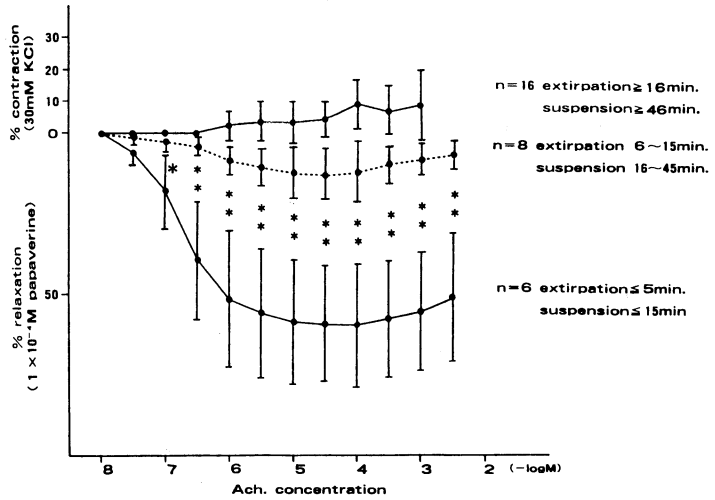


Fig. 3. Cumulative dose-response curves to Ach in canine basilar artery. Data are percent maximal relaxation induced by  $10^{-4}M$  papaverine and percent maximal contraction induced by 30 mM KCl (mean  $\pm$  S. D.). Difference between super-rapidly and rapidly mounted rings is significant (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

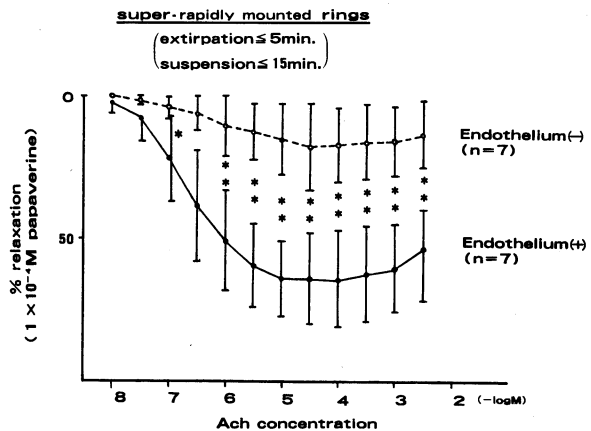


Fig. 4. Cumulative dose-response curves to Ach in super-rapidly mounted rings with and without endothelium. Data are percent maximal relaxation induced by  $10^{-4}M$  papaverine (mean  $\pm$  S. D.). Difference between rings with and without endothelium is significant (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

① 平衡状態における NA に対する反応

平衡状態における NA に対する反応も Ach に対する反応と同様、脳摘出時間と標本装着時間により異なった。超早期装着標本では NA に対し  $10^{-4}M$  以上でわずかな収縮反応が認め

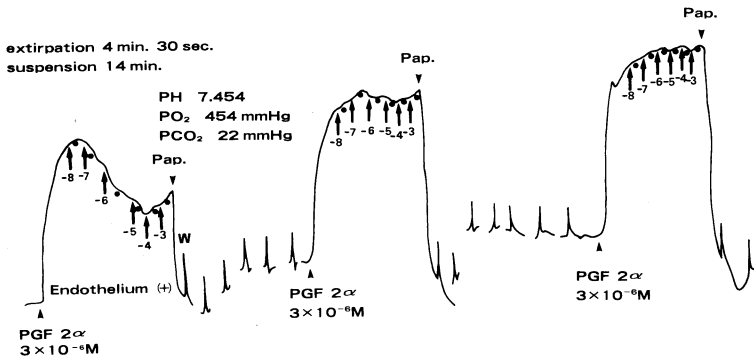


Fig. 5. Representative traces of repetitive administration of Ach in super-rapidly mounted rings. Final concentration of Ach is  $3 \times 10^{-8} M$ .

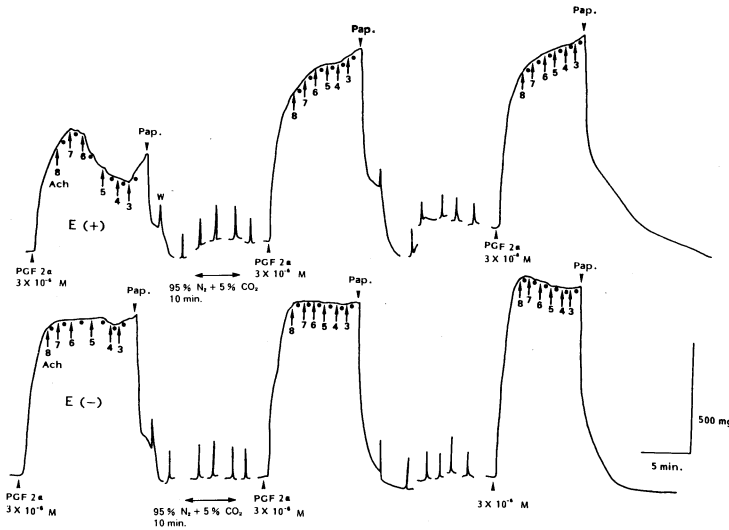


Fig. 6. Effects of short-term anoxia on the response to Ach in canine basilar arteries with (top) and without (bottom) endothelium

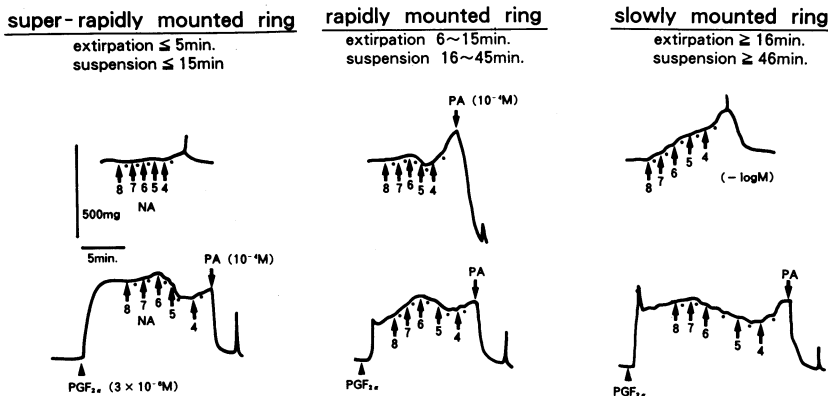


Fig. 7. Representative traces of administration of NA in canine basilar arteries under equilibrated (top) and contracted (bottom) condition

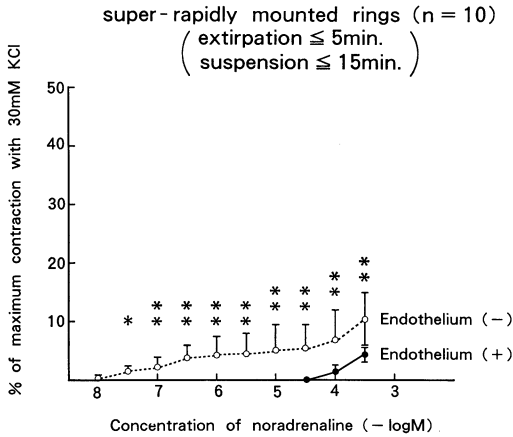
られるのみであった。早期装着標本では  $10^{-8} M$  からわずかな収縮反応が見られるが、 $10^{-6} M$  から弛緩反応に転じ、 $10^{-4} M$  から再び収縮するという三相性の反応が認められた。緩徐装着標本では  $10^{-8} M$  から用量依存性の収縮反応のみが認められた (Fig. 7, 上段)。内皮細胞剝離により、超早期装着標本では有意に収縮反応が増強したが (Fig. 8), 早期装着標本, 緩徐装着標本では、明らかな変化は認められなかった。

② 収縮状態における NA に対する反応

超早期装着標本, 早期装着標本, 緩徐装着標本のいずれにおいても、 $3 \times 10^{-6} M$  PGF<sub>2α</sub> にて収縮させた後 NA を投与すると、 $10^{-6} M$  から弛緩反応が認められ、 $10^{-4} M$  以上では収縮反応が認められた (Fig. 7, 下段)。

これらの弛緩・収縮反応は内皮細胞剝離により有意に減弱・消失した (Fig. 9)。

NA に対する内皮細胞依存性弛緩反応も Ach と同様に反応を繰り返すことにより減弱・消失した。しかし、95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> による anoxia 負荷に対しては明らかな変化は認めなかった。

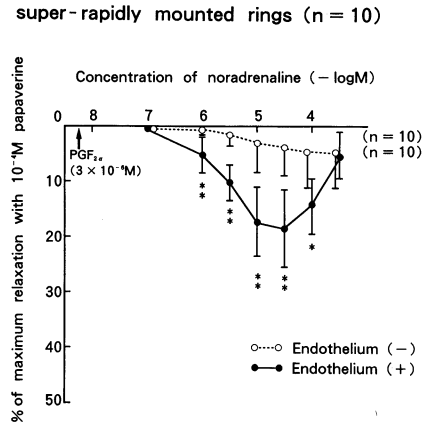


**Fig. 8.** Cumulative dose-response curves to NA in equilibrated super-rapidly mounted rings with and without endothelium. Data are percent maximal contraction induced by 30 mM KCl (mean±S. D.). Difference between rings with and without endothelium is significant (\* $p < 0.05$ , ‡ $p < 0.01$ ).

**IV. 考 察**

1980年, Furchgottら<sup>1)</sup>により内皮細胞依存性弛緩反応が報告され, さらに1988年, Yanagisawaらにより内皮細胞依存性収縮因子 (endothelin) が同定されるにいたり,<sup>13)</sup> 血管内皮細胞が収縮反応および弛緩反応の両面から血管反応制御に関与していることが明らかになった。これらの内皮細胞依存性血管反応は, 同一の血管作動物質に対して動物種や血管の部位により異なった反応を示すことが報告されているが, イヌ脳底動脈の Ach および NA に対する反応に関しては報告者による差が著しい。そこで著者はイヌの大きさ, 脱血法, 開頭法などにより脳底動脈摘出・処理時間が著しく異なってくることに着目し, 標本摘出・装着時間が血管反応性にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

本実験結果から, イヌ脳底動脈の Ach による内皮細胞依存性弛緩反応は標本摘出・装着時間の延長により減弱・消失し, 弛緩反応の繰り返しや短時間の anoxia によっても著明に減弱・消失するという非常に失われやすい反応で



**Fig. 9.** Cumulative dose-response curves to NA in contracted super-rapidly mounted rings with and without endothelium. Data are percent maximal relaxation induced by  $10^{-4}$  M papaverine (mean±S. D.). Difference between rings with and without endothelium is significant (\* $p < 0.05$ , ‡ $p < 0.01$ ).

あることが明らかとなった。これは内皮細胞自体の状態や実験環境により内皮細胞機能が容易に変化するためと考えられ, これまでの報告者による反応の違いが脳摘出時間や標本装着時間のいずれかあるいは両者を変えるいくつかの要因 (例えばイヌの大きさ, 脱血の方法, 開頭の方法, 標本の作製法など) によっても生じ得る可能性が示唆された。

また, これまでイヌ脳底動脈の Ach に対する反応が弛緩性なのか収縮性なのかの議論がなされてきたが, 最近, Chibaら<sup>14)</sup> は灌流法を用いた実験で, イヌ脳底動脈の内腔 (内皮細胞) 側に Ach を投与しわずかな弛緩反応に続いて収縮反応を認めたと報告している。このことは, イヌ脳底動脈は Ach に対し内皮細胞依存性弛緩・収縮の両反応を有することを示している。本実験結果の標本摘出・装着時間の延長, 弛緩反応の繰り返し, 短時間の anoxia などによる Ach に対する内皮細胞依存性弛緩反応の減弱は, 臓器槽内の内皮細胞機能が収縮反応優位に変化したことによるものと考えたい。

イヌ脳底動脈の NA に対する反応は, 平衡状態と収縮状態とでは差が認められた。平衡状

態にあるイヌ脳底動脈の NA に対する反応も標本摘出・装着時間の延長により収縮反応が増強し、超早期装着標本ではその収縮反応は内皮細胞剝離により増強した。収縮状態での NA に対する反応は低濃度では内皮細胞依存性弛緩反応を、高濃度では内皮細胞依存性収縮反応を示した。これまで報告されたイヌ脳底動脈の NA に対する反応はすべて収縮反応であり、<sup>11), 12)</sup>これには平滑筋  $\alpha_2$  受容体が関与していると報告されている。<sup>11)</sup> 今回観察された NA に対する内皮細胞依存性弛緩反応の報告はこれまでになく、注目すべき所見と考えられる。イヌ脳底動脈の NA に対する反応における内皮細胞の関与については、Usui ら<sup>9), 15)</sup> は内皮細胞依存性収縮反応と報告し、Nakagomi ら<sup>12)</sup> はその関与を否定している。Angus ら<sup>16)</sup> は、イヌ頸動脈や冠状動脈では NA の刺激により内皮細胞に存在する  $\alpha_2$  受容体を介し、内皮細胞由来血管弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor: EDRF) が遊離され、この EDRF と血管平滑筋の  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  受容体による反応により血管の反応性が決定されると報告している。本実験では内皮細胞剝離により超早期装着標本の NA に対する弛緩・収縮反応の両者が消失したが、このことは Angus らの説を支持していると考えられる。今回観察された NA による内皮細胞依存性弛緩反応は、anoxia や標本摘出・装着時間の延長により弛緩反応が減弱しない点で Ach による内皮細胞依存性弛緩反応と異なっている。これは、イヌ脳底動脈の内皮細胞が Ach および NA の刺激により性質の異なる EDRF を遊離することを示唆している。

摘出血管の血管作動物質に対する反応を、血管平滑筋自体の反応と内皮細胞依存性収縮・弛緩反応の総和と考えた場合、本実験のごとく標本摘出・装着時間により血管反応性が変化する要因として、(1) 脳摘出・標本装着中に内皮細胞の機能障害が出現する、(2) 脳摘出・標本装着中に血管の緊張保持のための EDRF の消費が起こり EDRF が枯渇する、(3) 脳摘出・標本装着中に内皮細胞上のレセプターの Ach や

NA に対する感受性が変化する、(4) 脳摘出・標本装着中に何らかの物質 (例えばヘモグロビン) により EDRF が不活化される、(5) 脳摘出・標本装着中に血管平滑筋自体の反応性が変化する、などが考えられる。これらの要因のうち (2) については、Ach および NA による内皮細胞依存性弛緩反応が反応の繰り返しにより減弱した事実は、臓器槽内の環境では内皮細胞が EDRF を再生産できないために有限であることを示唆している。最近、EDRF の一つであると考えられている nitric oxide (NO)<sup>17)</sup> が L-アルギニンから合成されていることが報告<sup>18)</sup> された。本実験で使用した修正 Krebs 液には L-アルギニンやその他のアミノ酸は含まれておらず、臓器槽内の環境は平滑筋の機能を保つためには十分であるが、内皮細胞の機能を保ったまま実験を行うには不十分である可能性が考えられる。超早期装着標本を 95%  $N_2$  + 5%  $CO_2$  による anoxia に 10 分間暴露すると Ach に対する内皮細胞依存性弛緩反応は消失し収縮反応に転じた。この実験結果からは、(1), (3), (5) の各要因に脳摘出中や標本装着中の低酸素あるいは無酸素が大きく影響していることを示している。

以上のように、血管内皮細胞は血管の収縮および弛緩の両反応にかかわり、ひいては血管反応制御に重要な役割を果たしていることは明らかである。したがって、イヌ脳底動脈の血管反応性を検討する際は、内皮細胞機能を保つために迅速に、そして、注意深く採取された超早期摘出標本を用いるべきであることを強調したい。

## ま と め

(1) イヌ脳底動脈の超早期摘出標本は Ach に対し用量依存性の弛緩反応を示し、この弛緩反応は内皮細胞剝離により消失した。この内皮細胞依存性弛緩反応は、標本摘出・装着時間の延長、弛緩反応の繰り返しや短時間の anoxia などにより減弱・消失した。

(2) 平衡状態にあるイヌ脳底動脈の NA に

対する収縮反応は標本摘出・装着時間の延長により増強した。一方、収縮状態ではNAに対し低濃度で内皮細胞依存性弛緩反応を、高濃度で内皮細胞依存性収縮反応を示した。この弛緩反応はAchによる内皮細胞依存性弛緩反応と同様、反応の繰り返しにより減弱した。

(3) イヌ脳底動脈の血管反応性を検討する際は、内皮細胞の機能を保つために慎重かつ迅速に摘出した超早期摘出標本を用いるべきであろう。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた川崎医科大学脳神経外科学教室 石井鏡二教授に深謝いたします。また、実験方法について御助言いただいた日研化学㈱ 鳥島豊成先生ならびに終始ご協力いただいた動物実験センター、動物飼育センターおよび当教室の諸兄に感謝いたします。

本論文の要旨は第47, 48回日本脳神経外科学会総会(神戸, 盛岡), 第29回日本脈管学会総会(浜松)において発表した。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 No. 63-102 によった。

## 文 献

- 1) Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373—376, 1980
- 2) Vanhoutte, P. M. and Rimele, T. J.: Role of the endothelium in the control of vascular smooth muscle function. *J. Physiol. (Paris)* 78 : 681—686, 1983
- 3) Vanhoutte, P. M., Rubanyi, G. M., Miller, V. M. and Houston, D. S.: Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann. Rev. Physiol.* 48 : 307—320, 1986
- 4) Toda, N.: The action of vasodilating drugs on isolated basilar, coronary and mesenteric arteries of the dog. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 191 : 139—146, 1974
- 5) Toda, N.: Acetylcholine-induced relaxation in isolated dog cerebral arteries. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 209 : 352—358, 1979
- 6) Kanamaru, K., Waga, S., Kojima, T., Fujimoto, K. and Itoh, H.: Endothelium-dependent relaxation of canine basilar arteries. *Stroke* 18 : 932—937, 1987
- 7) Nakagomi, T., Hongo, K., Kassell, N. F., Sasaki, T., Lehman, R. M., Ogawa, H., Vollmer, D. G. and Torner, J. C.: Pharmacological comparison of endothelium-dependent relaxation in isolated cerebral and extracerebral arteries. *J. Neurosurg.* 69 : 580—587, 1988
- 8) Tsukahara, T., Usui, H., Taniguchi, T., Shimohama, S., Fujiwara, M. and Handa, H.: Characterization of muscarinic cholinergic receptors in human and dog cerebral arteries. *Stroke* 17 : 300—305, 1986
- 9) Usui, H., Kurahashi, K., Ashida, K. and Fujiwara, M.: Acetylcholine-induced contractile response in canine basilar artery with activation of thromboxane A<sub>2</sub> synthesis sequence. *IRCS. Med. Sci.* 11 : 418—419, 1983
- 10) Katusic, Z. S., Shepherd, J. T. and Vanhoutte, P. M.: Endothelium-dependent contraction to calcium ionophore A23187, arachidonic acid, and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke* 19 : 476—479, 1988
- 11) Toda, N.: Alpha adrenergic receptor subtypes in human monkey and dog cerebral arteries. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 226 : 861—868, 1983
- 12) Nakagomi, T., Kassell, N. F., Sasaki, T., Lehman, R. M., Torner, J. C., Hongo, K. and Lee, J. H.: Effect of removal of the endothelium on vasoconstriction in canine and rabbit basilar arteries. *J. Neurosurg.* 68 : 757—766, 1988
- 13) Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki, T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular



endothelial cells. *Nature* 332 : 411—415, 1988

- 14) Chiba, S., Itoh, N. and Tsuji, T.: Vascular responses to intraluminal acetylcholine in isolated, perfused canine and simian basilar arteries. *J. auton. Pharmacol.* 6 : 101—107, 1986
- 15) Usui, H., Kurahashi, K., Shirahase, H., Fukui, K. and Fujiwara, M.: Endothelium-dependent vasoconstriction in response to noradrenaline in the canine cerebral artery. *Jpn. J. Pharmacol.* 44 : 228—231, 1987
- 16) Angus, J. A., Cocks, T. M. and Satoh, K.: The  $\alpha$  adrenoceptors on endothelial cells. *Federation Proc.* 45 : 2355—2359, 1986
- 17) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524—526, 1987
- 18) Palmer, R. J. M., Ashton, D. S. and Moncada, S.: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333 : 664—666, 1988