

フラボノイド“ケルセチン”の内皮由来過分極因子を介した弛緩作用におけるギャップジャンクションの役割について

富山大学大学院 医学薬学教育部 分子医科薬理学講座

西田 清一郎

目次

1. 要旨

2. 序文

2-1 自然界におけるフラボノイド“ケルセチン”

2-2 ケルセチンの臨床効果

2-3 ケルセチンの薬理作用

2-4 ケルセチンの血管弛緩作用（ラット大動脈における研究から）

2-4-1 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用

2-4-2 ケルセチンの血管平滑筋弛緩作用

2-5 EDHF (endothelium derived-hyperpolarization factor) について

2-6 ケルセチンによる EDHF 弛緩機序の可能性について

3. 研究材料および方法

3-1 方法

3-2 使用薬剤

3-3 統計

4. 結果

4-1 ケルセチンの腸間膜動脈における血管弛緩作用の内皮依存性

4-2 ケルセチンの血管弛緩作用における EDHF 関与の可能性

4-3 Supplemental Data

5. 考察

5-1 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用

5-2 ケルセチンの薬物動態

5-3 ケルセチンの血管弛緩作用と臨床応用の可能性

5-4 総括

6. 謝辞

7. 图表

8. 参考文献

1. 要旨

ケルセチンは代表的なフラボノイドのひとつで、健康管理や病態改善に対して有効と考えられるフィトケミカルのひとつである。食品では玉葱やワインに、また多数の漢方生薬に、広く含まれている。臨床効果として、抗動脈硬化作用、脳血管疾患の予防、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。ケルセチンの代表的な薬理作用のひとつに血管拡張作用がある。

ケルセチンは、ラット大動脈で濃度依存性の弛緩作用を惹起するが、その作用機序は多様であり、平滑筋に直接的に作用する Ca^{2+} チャンネル拮抗作用に加え、内皮依存性の弛緩作用を有することを、私は報告してきており、内皮依存性大動脈弛緩作用は、内皮由来一酸化窒素 (NO) によるものであった。大動脈のような導管血管と、腸間膜動脈のような小血管では、異なった内皮依存性弛緩作用機序が働いていることが知られている。そこで本研究では、さらに、ラット腸間膜動脈の輪状標本を用いて、ケルセチンの小血管における内皮依存性の弛緩作用機序について検討した。

ケルセチン ($0.1\sim 100\ \mu\text{M}$) は、ノルエピネフリン (NE) $1\ \mu\text{M}$ で収縮させたラット腸間膜動脈を、濃度依存的に弛緩させた。血管内皮除去は、ケルセチンの弛緩作用を有意に減弱させた。ケルセチンの弛緩作用は、NO 合成阻害薬 (L-NAME) とシクロオキシゲナーゼ阻害薬 (インドメタシン) に対して軽度の減弱を認めたが、強い影響は受けなかった。内皮依存性過分極因子 (EDHF) の関与を調べるため、さらに TEA ($1\ \text{mM}$) を前投与したが、ケルセチンの弛緩作用は減弱傾向を認めたものの、有意な弛緩作用の減弱は認められなかった。しかし、L-NAME とインドメタシンを前投与した状態に、さらにギャップジャンクション阻害薬である 18α -グリチルレチン酸 ($100\ \mu\text{M}$) と 18β -グリチルレチン酸 ($50\ \mu\text{M}$) を投与すると、血管弛緩作用は有意に減弱した。以上の結果から、ケルセチンは、ギャップジャンクションを介した EDHF による血管内皮依存性の弛緩作用を示していると考えられた。

2. 序文

2-1 自然界におけるフラボノイド “ケルセチン (quercetin)”

フラボノイドは、ポリフェノール的一种で、代表的なフラボノイドに、カテキンやフラボノールがある。自然界には、4000種類を超えるフラボノイドが存在するといわれている(1)。ケルセチンはフラボノールの一つで、広く植物に存在する。フラボノイドは、植物中に配糖体として存在していることが多く、ケルセチンも植物中には配糖体として含まれていることが多い。ケルセチンの代表的な配糖体としてルチン、クエルシトリンがある(図1)。ケルセチンは、玉葱、リンゴ、グレープフルーツ、野菜、ワインに多く含まれる(1-3)が、食事から摂取される主要なフラボノイドの30~70%は、ケルセチンであることが、複数報告されている(3,4)。このほか、ケルセチンは、薬用植物にも、広く含まれている。筆者は、薬用ハーブのひとつである、イチョウ葉エキス剤にもルチン(ケルセチン)が含まれ、血管弛緩作用の一部を担っていることを、報告している(5)。その他、漢方薬や中医学で使用される生薬にもケルセチン、もしくはケルセチン配糖体であるルチンが含有されており、^{れんぎょう}連翹(6)、^{きっか}菊花(7)、^{ういきょう}茴香(8)、^{じゅうやく}十葉(9)、^{あせんやく}阿仙薬(10)、^{ひととせよもぎ}一年蓬(10)、^{さんざし}山査子(10)、^{でんしちにんじん}田七人參(10)、ゲンノショウコ(10)などに含有されていることが知られている。

以上から、ケルセチンの理解を深めることは、食生活による健康への影響やリスクの改善効果の理解、さらにハーブや漢方生薬の薬効の理解につながる。また多種存在するフラボノイド類の薬効を理解する一助となり、フラボノイドを含む漢方生薬やハーブ類の生体効用を理解するうえで重要であると考えられる。

2-2 ケルセチンの臨床効果

ケルセチンの臨床的な効能については、以前から注目され研究されてきた。フラボノイド類に関する初期の疫学的研究として、ケルセチンを含むフラボノイド類を、常習的に摂取している場合の、発がんリスクの調査がある。ケルセチンの摂取量が多い

と肺がん (11) , 胃がん (12)、大腸がん (13) の発症リスクが低下すると報告されている。その機序としては、ケルセチンの抗酸化作用が、抗腫瘍効果をもたらす機序と、ケルセチンの長期的な投与では、腫瘍細胞においては、酸化促進的に作用し、アポトーシスを誘導すると報告されている (14)。

ワインに含まれるポリフェノール類の摂取が、心血管疾患の発症リスクの低減に貢献することが、報告され始めたのが、1999年から2000年ごろであった (15)。ワインが、アルコール飲料であるにも関わらず、心血管イベントを軽減することから、当時は、“フレンチ パラドックス” と呼ばれた (16)。この他、フラボノイドを含む野菜や果物の摂取も、冠動脈疾患や心血管イベントを軽減することが報告された (17-20)。

ポリフェノール類のひとつであるケルセチンの循環器疾患への臨床効果も確かめられてきた。ケルセチンをエキス剤などによって、補充した場合の健康改善効果について報告があり、ケルセチンは、血圧を低下し、高血圧を改善する効果などが報告されている (21, 22)。

2-3 ケルセチンの薬理作用

ケルセチンの薬理作用は、非常に多様である。降圧作用 (21-23)、抗酸化作用 (14, 24)、抗炎症作用 (25, 26)、抗動脈硬化作用 (1, 25, 26)、抗腫瘍作用 (14) などが知られている。ケルセチンは降圧作用によって血管緊張を和らげ、抗酸化作用、および抗炎症作用によって血管床における炎症を抑え動脈硬化の予防、且つ進行を妨げると考えられる。ケルセチンによる降圧作用には大きく 2 つの薬理作用機序が、明らかになっており、血管に対する拡張作用 (27, 28) と、ACE 阻害作用がある (29)。私は、ケルセチンの血管弛緩作用を継続して研究してきた。本研究報告は、大動脈のような導血管と腸間膜動脈のような小血管におけるケルセチンの異なった血管弛緩作用機序に関する報告である。

2-4 ケルセチンの血管弛緩作用（ラット大動脈における研究から）

我々は、ラット大動脈切片を用いた実験を通じて、ケルセチンの血管弛緩作用の検討を行い、主に 2 編の論文を通して、ケルセチンが複数の弛緩作用機序をもっていることを、報告しており (30, 31)、本論文ではこの結果も含めて、ラット大動脈と腸間膜動脈におけるケルセチンの血管弛緩作用機序の違いを論じる。

2-4-1 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用

まず複数の NO 合成阻害薬 (L-NMMA、L-NAME) 投与と内皮除去などを行い、内皮依存性の弛緩作用を示した (図 2)。ケルセチンの血管弛緩作用は、L-NMMA、L-NAME および内皮除去によって弛緩作用が減弱することから、ケルセチンは、内皮依存性の血管弛緩作用を示すことがわかる。大動脈における血管内皮依存性の弛緩作用は、主に内皮による NO 合成促進によっておこることを報告した (30, 31)。

2-4-2 ケルセチンの血管平滑筋弛緩作用

ケルセチンは、KCl で収縮させた大動脈を強く弛緩させる。ケルセチンの血管弛緩作用は Ca^{2+} 拮抗薬であるニカルジピン前投与で減弱し、 Ca^{2+} -free 溶液中でも弛緩作用が極度に減弱するため、 Ca^{2+} チャネルを介した阻害作用があると結論づけられた (31)。しかし、一方で平滑筋細胞におけるパッチクランプ実験において、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した電流を増幅したと報告があるが (32)、共同研究者の佐藤による、心室筋細胞における電気生理学的実験では、ケルセチンは強力に Ca^{2+} 電流を減弱させた (33)。また、平滑筋を用いた他の報告では、カルシウム電流を、ケルセチンの臨床的有効濃度においては阻害すると報告されている (34)。

さらに、ケルセチンは PKC (protein kinase C) の阻害作用も発揮することが、判明して

いる(27, 35)。私の実験でも、複数の PKC 阻害剤の存在下で、ケルセチンの血管弛緩作用が減弱することから、PKC 阻害作用を介した血管弛緩作用をもつことが示されている(31)。PKC には複数のサブタイプが存在するが、PKC 阻害剤 (Ro-31-8425, Gö6983) の感受性の違いから、私の実験において、ケルセチンは血管平滑筋細胞 PKC δ に対する親和性が強いと推測された(31)。次に、ケルセチンの Ca²⁺依存性 K⁺チャネル(K_{Ca}) への影響を検討した。ラット大動脈において、血管内皮を除去した状態での実験で非特異的 K_{Ca} チャネル阻害薬である TEA (tetraethylammonium)の前投与を行ったところ、ケルセチンの弛緩作用は減弱した(30)。そのため、ラット大動脈では、ケルセチンは直接 K_{Ca} チャネルを介して、平滑筋を過分極させていると考えられた。K_{Ca} チャネルはコンダクタンスの違いから BK(Ca)、IK(Ca)、SK(Ca)チャネルに分類されるが、ラット大動脈における実験では apamine, charybdotoxin, TEA を使用し、その影響の差異から、ケルセチンの SK(Ca)チャネルへの影響が、明らかになった(30)。さらに、ラット尾動脈ではイベリトキシンでも影響を受ける(36)ことが示されている。したがって、ケルセチンは BK(Ca)チャネルにも作用して、平滑筋細胞を過分極していると考えられる。ケルセチンの BK(Ca)チャネル活性化作用は PKG (protein kinase G) を介して活性化され(36)、また細胞内の過酸化水素(H₂O₂)産生の活性化(37)を介しているという報告もある。しかしながら、ケルセチンは K_{Ca} チャネル作用に影響しないという報告(28)も存在するが、ケルセチンの K_{Ca} チャネル作用は電気生理学的な見地からも確かめられており(36)、私の実験結果からも生体で血管弛緩作用に大きな役割を果たしているものと結論づけられた(30)。

2-5 EDHF (endothelium-derived hyperpolarization factor:血管内皮依存性過分極因子) について

内皮依存性の弛緩作用は、大動脈のような導管血管と冠動脈や腸間膜動脈のような小血管において、異なる機序が作用することが報告されている(38)。小血管における

内皮依存性の弛緩作用は、EDHF による弛緩機序が優位に作用していることが報告されている (38)。一方、大動脈のような導管血管では、EDRF (Endothelium-derived relaxing factor: 血管内皮由来弛緩因子) が、内皮依存性の弛緩作用の中心的役割を果たしていると考えられており、その本態は NO と考えられている。

EDHF とは、内皮から発生する NO もしくはプロスタグランジン I₂ (PGI₂) 以外の何らかの因子で、平滑筋を過分極させ、弛緩させる機序として定義されている。EDHF は、まだ、その本体については明らかになっていない。EDHF には、いくつかの候補が挙げられている。1) 血管内皮から放出されるカリウム (39)、2) 血管内皮から放出される過酸化水素 (40)、3) 血管内皮と平滑筋間および平滑筋間をつなぐギャップジャンクションの電流 (41、42)、4) EET (epoxyeicosatrienoic acids) (43) などが報告されている。現在、EDHF は複数の因子の総合的な結果として発現されているという理解がされている場合があるが、どの機序に対しても何らかの反論や判例があり、まだ結論にはいたっていない (44)。

血管内皮依存性の弛緩作用では、内皮細胞におけるカルシウム濃度の上昇が重要である。内皮における細胞内カルシウム濃度の上昇は、NO 産生を促進し (45)、過酸化水素の発生 (40)、内皮細胞の過分極を、K_{Ca} チャネルを介して発生させる (46)。さらに、EDHF の発現に際しては、血管内皮の細胞内のカルシウム濃度が上昇することが、最初の薬理機序として知られている (47-49)。生体における血管内皮細胞のカルシウム濃度をあげる機序としては、アセチルコリンによるムスカリン受容体刺激作用や、それぞれのレセプター刺激、および、ずり応力などが挙げられる (44, 49)。EDHF による血管弛緩作用機序を、図 4 にまとめた。

2-6 ケルセチンによる EDHF 弛緩機序の可能性について

血管内皮依存性の弛緩作用は、EDRF (NO) も EDHF も、血管内皮細胞の、細胞内カルシウム濃度が上昇した結果として、発揮される。ケルセチンも内皮細胞のカルシウム

濃度を上昇させることが報告されており、内皮細胞のカルシウム濃度の上昇の結果、eNOS が、活性化し、NO が産生されることが分かっている (50, 51)。小血管において作動する EDHF を介した弛緩作用も、内皮細胞のカルシウム濃度上昇を介して発生するが、ケルセチンの内皮細胞のカルシウム濃度上昇作用は、小血管において EDHF による弛緩作用機序を発揮させる可能性がある。ポリフェノール類が EDHF を介した血管弛緩作用を示す可能性は言及されていた (16) が、個別のフラボノイドであるケルセチンが、腸間膜動脈のような小血管において EDHF を示すかどうかを、具体的に報告した研究は、これまでにない。本研究では、小血管におけるケルセチンの血管弛緩作用について、EDHF (血管内皮由来過分極因子) を介した血管弛緩作用を、示すかについて、検討した。

3. 研究材料および方法

3-1 方法

全ての実験は、奈良県立医科大学 動物愛護指針に乗っ取って、行われた。雄性 Wistar ラット (10-15 週) をエーテルで麻酔後、安楽死させ、大動脈もしくは、腸間膜動脈を摘出し、脂肪組織などを剥離後、大動脈は 3 mm の輪状標本、腸間膜動脈は、1 mm の輪状標本を作成した。実験は、Krebs 液 (NaCl 118 mM、KCl 4.6 mM、MgSO₄ 1.2 mM、KH₂PO₄ 1.2 mM、glucose 11.1 mM、NaHCO₃ 27.2 mM、ethylene glycol-0,0'-bis (2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) 0.03 mM、CaCl₂ 1.8 mM) 内に、血管を固定し行われた。Krebs 液は 37.0°C に保ち、95%O₂、5%CO₂ を環流させた。ラット大動脈には、1.2 g、ラット腸間膜動脈は、0.5 g の静止張力をかけて、安静を 40 分保ち、ラット大動脈は、5 μM の NE を、腸間膜動脈には、1 μM の NE を投与して、拘縮させ、トランスデューサーを用いて、血管緊張の変化を測定した。用いたトランスデューサーは、ラット大動脈には、TB652-T (日本光電、京都) を、ラット腸間膜動脈には、UL-10GR (ミネバ、東京) を使用した。

3-2 使用薬剤

実験で使用した薬剤は、ケルセチン (quercetin) (Tocris Biosci., Northpoint, UK)、L-NAME (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA.)、インドメタシン (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)、tetraethylammonium (TEA) (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)、18α-glycyrrhetic acid および 18β-glycyrrhetic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を使用した。

3-3 測定および統計

NE で誘発した血管の最大収縮に対して、ケルセチンが、どの程度弛緩させたかを、% 表示した。収縮しない場合を 0%、全て弛緩させた場合を 100% とした。全ての数値は、

平均値と標準誤差で表示されている。ウェルチの t 検定 (Unpaired Student' s t-test) を用いて検定した。有意差は、 $p < 0.05$ 以下で判定した。

4. 結果

4-1 ケルセチンの腸間膜動脈における血管弛緩作用の内皮依存性

ケルセチン (0.1~100 μM) は、NE (1 μM) で収縮させた血管を、濃度依存性に弛緩させた (表 1)。ケルセチンの腸間膜動脈における血管弛緩作用は、L-NAME (100 μM) の前投与によって、有意に減弱した。血管内皮除去を行うと、血管弛緩作用は減弱した。以上から、ケルセチンの弛緩作用は腸間膜動脈においても血管内皮依存性があることが分かるが、内皮除去が、L-NAME よりも強く弛緩作用を抑制するので、NO 以外に、機序が存在することが、示唆された。この機序が、EDHF であるかどうかを次に示す実験で検証した。

4-2 ケルセチンの血管弛緩作用における EDHF 関与の可能性

L-NAME (100 μM) およびインドメサシン (10 μM) を前投与後も、残っている血管弛緩作用に対して、EDHF の関与を調べるため、TEA (100 μM) の前投与を行ったが、やや、弛緩作用は減弱したものの、はっきりとした変化はみられなかった (表 1)。さらに、TEA を 1 mM に増量しても、有意な弛緩作用の変化は、一部にしか、得られなかった (図 7)。一方、ギャップジャンクション阻害薬である 18 α -グリチルレチン酸 100 μM と 18 β -グリチルレチン酸 50 μM を前投与したところ、ケルセチンの血管弛緩作用は有意に減弱した (図 2)。血管内皮を剥離すると、ケルセチンの弛緩作用は、L-NAME とインドメサシンを前投与した場合よりも強く弛緩作用は減弱し、18 α -と 18 β -グリチルレチン酸を前投与した場合と同程度に減弱した。

4-3 Supplemental Data

ケルセチンの血管内皮依存性は、大動脈において NO 合成促進を行い、腸間膜動脈では、EDHF を促進することから、その内皮依存性の弛緩作用はアセチルコリンなどに類似している。そのため、ムスカリン受容体を介した内皮依存性弛緩作用を介していな

いかを検討するため、アトロピンの前投与を行った。ラット大動脈の血管弛緩作用は、アトロピン ($1\ \mu\text{M}$) で減弱した。さらに、L-NAME ($100\ \mu\text{M}$) を追加投与しても、さらに血管弛緩作用が減弱する現象はみられなかったため、内皮における NO 産生の大部分を、ムスカリン受容体刺激作用を介して、発揮している可能性が、考えられた (図 9A)。しかし、ラット腸間膜動脈において、同様に、アトロピン ($1\ \mu\text{M}$) を投与しても、弛緩作用の減弱はみられなかったため、ムスカリン受容体の関与は考えにくい結果であった (図 9B)。

5. 考察

本研究において、ケルセチンは、腸間膜動脈においても、濃度依存性に弛緩作用を示し、血管内皮依存性の弛緩作用を示した。ケルセチンの腸間膜動脈における内皮依存性の弛緩作用は、NO 合成作用によるものが、一部認められるが、内皮依存性の弛緩作用の大部分を、ギャップジャンクションを介した EDHF による弛緩作用によって発揮していることを示した。ケルセチンが、EDHF による弛緩作用を示すことを報告したのは、本研究が初めての報告である。

5-1 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用

ケルセチンの血管内皮依存性の弛緩作用について検討した。当初、ラット大動脈、および腸間膜動脈における報告で、ケルセチンの弛緩作用には、内皮依存性作用はないと報告されていた(27, 28)。私のラット大動脈血管実験では、ケルセチンの血管弛緩作用は、NO 合成阻害薬 (L-NAME、L-NMMA) で減弱し、また血管内皮除去によっても弛緩作用の減弱を認めた(30、31)。培養内皮細胞による研究でも、ケルセチンは血管内皮細胞内の Ca^{2+} 濃度を上昇し、NO 合成酵素 (NOS) を活性化し、NO 合成を促進し、細胞外に NO 遊離することが、報告されている(50, 51)。本研究において、我々の実験では、ラット腸間膜動脈のような小血管においても、血管内皮除去の条件下、ケルセチンの血管弛緩作用が有意に減弱したので、血管内皮依存性弛緩作用を確認している。L-NAME で減弱する以上に、内皮除去によって、弛緩作用は減弱するので、ケルセチンは、内皮において、NO 合成促進作用以外の内皮依存性弛緩作用機序が働いていることが、推測される。腸間膜動脈や冠動脈のような細い血管の弛緩作用では、EDHF による弛緩が関与していると考えられているが、その実態については、いくつかの起因候補が存在するものの結論は出していない。本研究では、ギャップジャンクションを介した機序に注目して、ケルセチンの弛緩作用における EDHF の関与を検討した。

我々のラット腸間膜動脈実験において、ケルセチンの EDHF の関与を検証するため、

血管内皮機能を抑制した状態下で、TEA (1 mM) 投与を行ったところ、ケルセチンの血管弛緩作用は、減弱傾向を示したものの、有意な差はみられなかった。アセチルコリンもしくはカルバコールによる腸間膜動脈における EDHF を誘発する実験では、TEA (1 mM) で、減弱することが報告されている (42, 52) ので、ケルセチンによる EDHF も TEA で阻害されることが予想されたが、本研究では阻害されなかった。しかし、EDHF を誘発する物質や血管の種類などによって、TEA やその他のカリウムチャンネル阻害薬における反応性に違いがあることが、報告されている (44, 52)。アセチルコリンやカルバコールによる EDHF は TEA によって阻害されるが (42, 52)、A23187 のようなカルシウム・イオノフォアによって誘発される EDHF は TEA (1 mM) によって阻害されないことが報告されており (52)、ケルセチンの場合とよく似た現象が報告されている。カリウムチャンネル阻害薬に対する反応性の差異だけでは、EDHF の関与の有無を区別しきれないことが分かっている。このような差異を生じている正確な理由は、まだ判明していない (44) が、今後 EDHF 本態の解明とともに明らかにしていくべき課題である。

ケルセチンが、TEA の影響を受けなかったひとつの理由として、ケルセチンそのものが、直接 K_{Ca} チャンネルを活性化し、平滑筋を過分極させる機序が、関与していることが考えられる。我々は、ケルセチンの SK_{Ca} チャンネル活性化作用を報告した (30) が、この他 BK_{Ca} チャンネルへの影響が報告されている (36, 37)。このように、ケルセチンは血管平滑筋の複数の K_{Ca} チャンネルを、EDHF を介さずに、直接活性化する機序を有している。また、その K_{Ca} 活性化機序も複数存在し、過酸化水素複数を介する機序 (37) や、PKG を介した活性化機序が報告されている (36)。このように、ケルセチンは、 K_{Ca} チャンネルの直接活性化機序を複数もっているため、TEA (1 mM) でも、十分な抑制効果が、表れにくかった可能性がある。

本研究では、ケルセチンの EDHF には、ギャップジャンクションが関与している可能性を、検証するため、 $18-\alpha$ と $18-\beta$ -グリチルレチン酸 (ギャップジャンクション阻害薬) の前投与によって検討した。その結果、腸間膜動脈の弛緩作用は、有意に減弱し

た。このことから、ケルセチンはギャップジャンクションを介した血管弛緩作用をもつ可能性が考えられる。ケルセチンは、血管内皮細胞を、過分極させることが報告されている(53)。血管内皮の過分極機序は、内皮細胞の K_{Ca} チャンネルに対するケルセチンによる活性化作用(53)と、血管内皮の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用(50, 51)の両方が関与している可能性がある。ケルセチンによって、発生した血管内皮細胞の過分極はギャップジャンクションを介して伝達され、血管平滑筋を過分極させると考えられる。(図2)。本研究では、ケルセチンの弛緩作用は、ギャップジャンクション阻害剤で抑制されたが、これは、内皮で発生した過分極の伝達が、阻害剤で、阻害されたため、減弱したと考えられる。ケルセチンのギャップジャンクションを介した EDHF による血管弛緩作用機序を図 10 に、まとめた。

ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用は、内皮細胞におけるカルシウム濃度上昇をきっかけに発生すると考えられ、大動脈において NO 合成促進を行い、腸間膜動脈では EDHF を促進することから、その内皮依存性の弛緩作用はアセチルコリンなどに類似している。そのため、ムスカリン受容体を介した内皮依存性弛緩作用を介していないかを検討するため、アトロピンの前投与を行ったところ、ラット大動脈の血管弛緩作用は、アトロピン (1 μ M) で減弱したが、腸間膜動脈では減弱しなかった。ケルセチンの内皮におけるカルシウム濃度上昇のメカニズムは、くわしくは、現在も、不明である。大動脈においては、私の研究では、ムスカリン受容体を介していることが分かったが、腸間膜動脈では影響なかったので、細胞内カルシウムを上昇させる機序は複数存在していると考えられ、ムスカリン受容体刺激作用は、そのひとつに過ぎないと考えられる。今後、さらに研究が必要である。

5-2 ケルセチンの薬物動態

ケルセチンはルチン配糖体として、食物および漢方生薬に含まれていることが多いが、消化吸収時、加水分解を受けアグリコンであるケルセチンとして吸収され、さら

に肝臓にてグルクロン酸抱合を受ける(54)。ケルセチンの薬理作用は、アグリコンであるケルセチンにおいて理解する方がよい。私の実験においても、ケルセチン配糖体であるルチンも血管に対して、濃度依存性の血管弛緩作用を示す(5)が、基本構造と同じくするルチンとケルセチンでも、ケルセチンの方がより強い血管弛緩作用を示した(5)。また、ルチンも最終的に、ケルセチンとして消化吸収されるので、ケルセチンの吸収や薬理作用を知ることが重要となる。常習的に果物や野菜を摂取する人の平均ケルセチン血中濃度は 52 nM と報告されている(54)。また、ケルセチンを 500 mg 頓服させた場合の血中濃度は約 1-3 μM まで上昇する(55)。私の実験では、ケルセチンは 0.1-0.3 μM から、ラット大動脈、および腸間膜動脈に対して、血管弛緩作用を表し始めるので、ケルセチンは臨床でも十分、血管弛緩作用を期待できると推測される。

5-3 ケルセチンの血管弛緩作用と臨床応用の可能性

ケルセチンによる血管弛緩作用は、血圧降下作用や臓器循環改善効果をもたらす可能性がある。ケルセチンによる降圧効果が報告されているが、このケルセチンの血管弛緩作用が、ACE 阻害作用と共に、降圧効果に貢献していると考えられる。

血管弛緩機序のひとつである EDHF は、病態によってその作用が変化することが、知られており、加齢や動脈硬化、糖尿病などで、減弱することが分かっている(57, 58)。糖尿病では、内皮における PDE(phosphodiesterase)3 の亢進や cyclic AMP の低下による PKA(protein kinase A)の機能低下が、ギャップジャンクションを介した EDHF による弛緩作用を低下させることが報告されている(56)。この他、内皮における酸化ストレス (ROS(reactive oxygen species)の蓄積)が、内皮における NO の合成や EDHF を抑制することが報告されている(57)。また、大血管よりも、微小血管(腎血管、網膜)において、EDHF が優位に作用することが分かっているが、糖尿病においては、EDHF の低下が、腎症や網膜症における血管障害の進展に関連している可能性も考えられている(56, 57)。よって、EDHF の反応性を改善させることは、これらの臓器における血

流を改善し、臓器障害を改善させる可能性が考えられている (56, 57)。ケルセチンはすでに、心臓血管弛緩や脳血管障害の予防効果が報告されているが (17-20)、ケルセチンの血管弛緩作用や、EDHF を介した弛緩作用の影響も考えられる。糖尿病ラットにおけるラット大動脈を用いた実験では、ケルセチンの 6 週間にわたる経口投与が、内皮機能の低下を防ぎ、内皮依存性の弛緩作用が保たれていたと報告されている (58)。ケルセチンのこのような内皮機能保護作用や、本研究で明らかになった EDHF 刺激作用が、病態の改善や疾病の予防効果に、どのように貢献しうるかについて、さらに研究を深めていく必要がある。

5-4 総括

本研究において、ケルセチンは、ギャップジャンクションを介して、EDHF による血管弛緩作用を発揮することを、はじめて報告した。

ケルセチンは、血管内皮依存性弛緩作用 (EDRF と EDHF)、平滑筋における弛緩作用 (Ca^{2+} チャネル阻害作用、 K_{Ca} 活性作用、PKC 阻害作用) によって血管弛緩作用を示すが、このケルセチンの血管弛緩作用は、临床上、降圧作用や抗動脈硬化作用などに貢献していると考えられる。

同様な薬理作用は、他の多くのフラボノイド類にも期待され、フラボノイド類を含有する生薬も同様な機序で血管緊張の調節に貢献していると推測される。また、多種のフラボノイドを含有する漢方生薬や健康食品も同様な効果をもたらす可能性が期待される。

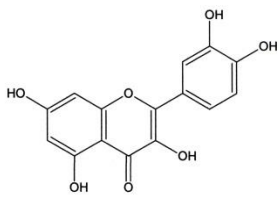
ケルセチンは、非常に複雑で多岐にわたった多彩な作用機序による血管弛緩作用を示す。この特性を理解し応用できれば、植物由来構造をもつフィトケミカルを、多彩な血管弛緩作用機序を有した血管弛緩物質として創薬できる可能性も、期待できる。今後のさらなる研究発展につなげていきたいと考えている。

6. 謝辞

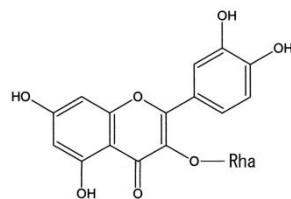
本研究は、奈良県立医科大学（現 四天王寺大学）佐藤 広康先生の御指導のもと、実験を行った。論文作成に、当たっては、佐藤先生 並びに、奈良県立医科大学（現 国際医療福祉大学）山下 勝幸 先生のご指導を賜った。本学位論文作成に当たり、同志社女子大学 土田 勝晴 先生、ならびに富山大学 服部 裕一 先生のご指導を賜った。ここに、心より感謝を申し上げる。

7. 図表

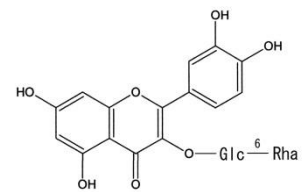
図1 ケルセチンおよびケルセチン配糖体 構造式



ケルセチン



クエルシトリン



ルチン

Rha : ラムノース

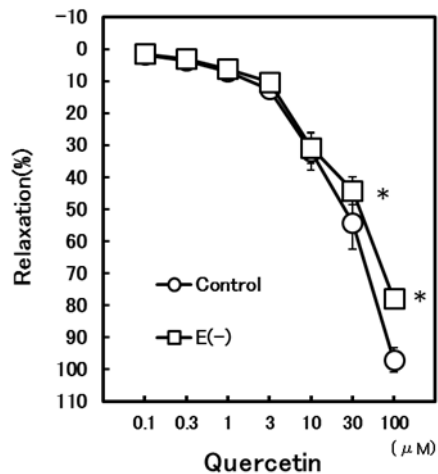
Glc : グルコース

表1 ケルセチンの臨床効果および薬理作用

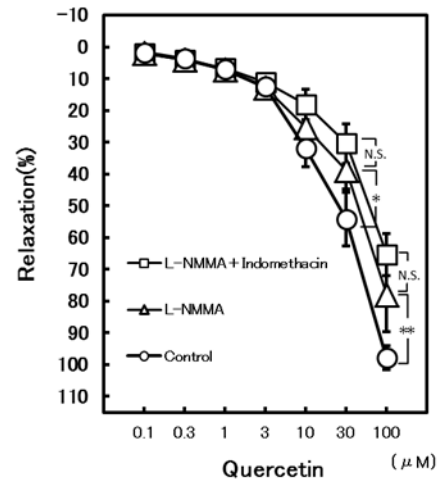
臨床効果	薬理作用	参考文献
抗腫瘍作用	アポトーシスの誘導、抗酸化作用	11)12)13)14)
心血管疾患予防効果	抗動脈硬化作用、抗酸化作用、抗炎症作用	1)17)18)19)20)
降圧作用	ACE 阻害作用、血管弛緩作用	21)22)29)30)31)

図2 ケルセチン血管内皮依存性弛緩作用 (大動脈)

A)



B)



A) ケルセチン血管弛緩作用内皮除去の影響

ケルセチンの弛緩作用は血管内皮除去によって、減弱した。

○ : コントロール (n = 10) △ : 内皮除去 (n = 6)

B) L-NMMA およびインドメサシンによるケルセチン血管弛緩作用の変化

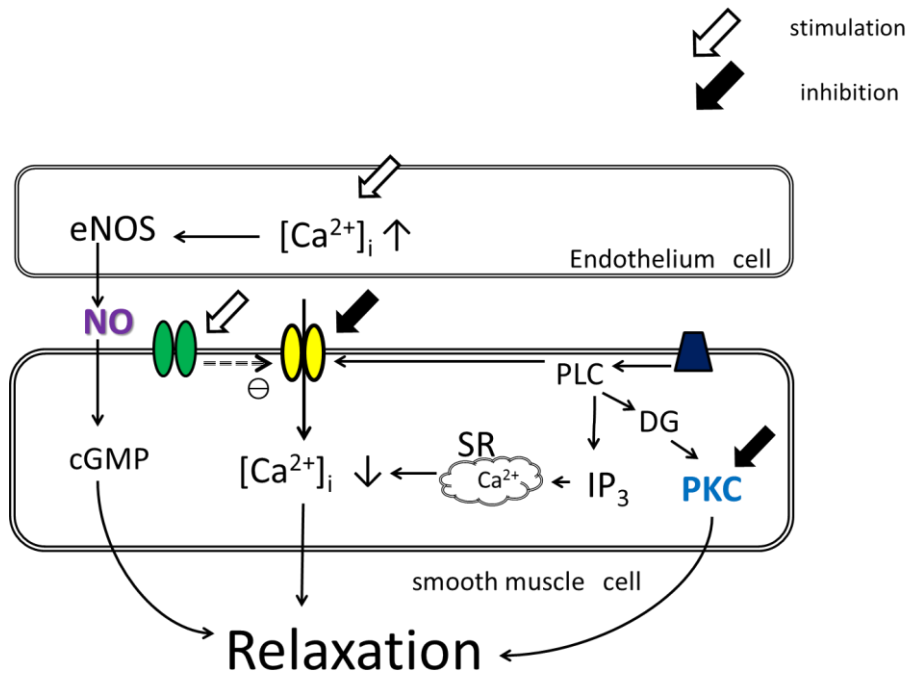
ケルセチンの弛緩作用は、NO 合成酵素 (NOS) 阻害薬である L-NMMA の前投与によって、ケルセチンが 30 μM および 100 μM 投与時に減弱した。インドメタシンを追加前投与しても、影響は、なかった。ケルセチンの弛緩作用には、内皮における NO の合成促進が、考えられる。




○ : コントロール (n = 10) △ : L-NMMA (n = 5) □ : L-NMMA+indomethacin (n = 5)

参考文献 : 30) 31) より

実験方法は、本論文 3 節を参照

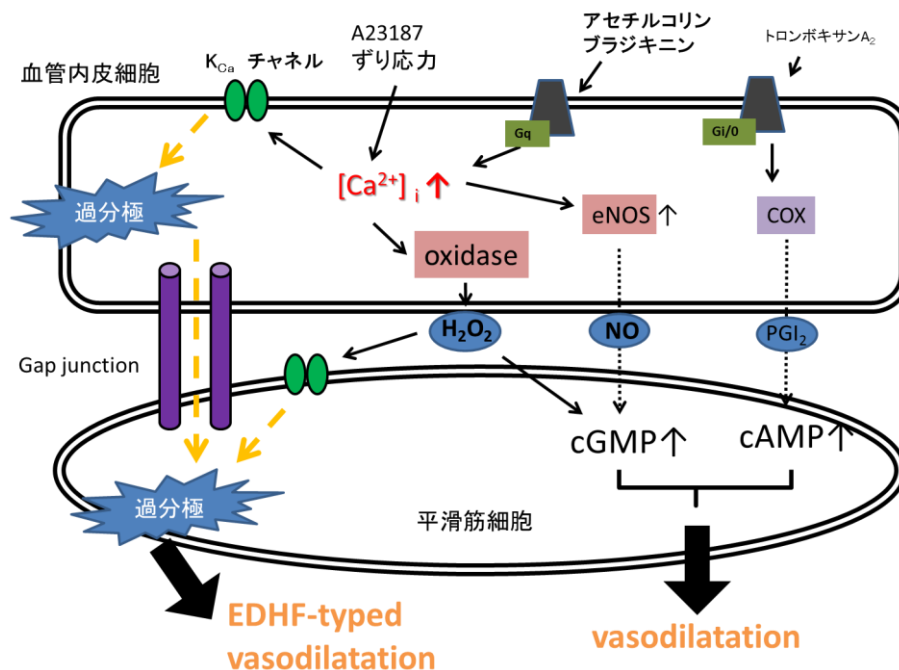
図 3 : ケルセチンによる血管弛緩作用機序 (ラット大動脈)



-  Ca channel
-  K_{Ca} channel
-  G-protein coupled receptor

ケルセチンの血管弛緩作用機序：内皮からの NO 遊離促進作用は、大動脈における内皮依存性弛緩作用の中心的な役割を果たしている。平滑筋において、ケルセチンは平滑筋におけるカルシウムチャネル阻害作用で弛緩させる。ケルセチンは、さらに K_{Ca} チャネル活性化作用による過分極の発生によって、弛緩させる。この過分極は、カルシウムチャネルの活性も低下させ、細胞内のカルシウム濃度を低下させる。このほか、ケルセチンは、 $PKC \delta$ を阻害し、カルシウム感受性を低下させ、血管を弛緩させる。

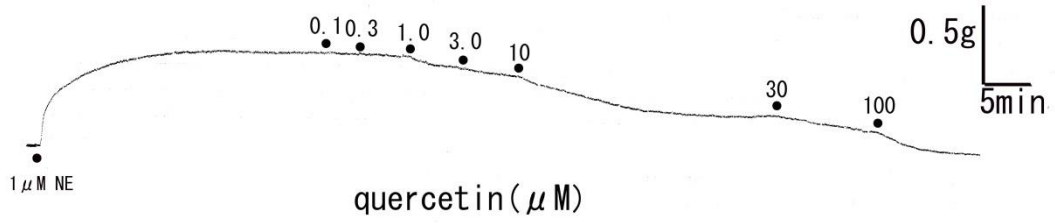
図4 血管内皮依存性弛緩作用機序 (EDHF, EDRF による血管弛緩作用機序)



様々な刺激で、血管内皮の細胞内カルシウム濃度が上昇すると、NOの合成および過酸化水素(H₂O₂)の産生が促進される。NOは、EDRF (endothelium-derived relaxing factor)の主たる分子として知られている。NOおよびPGI₂以外の、内皮由来の弛緩作用で、平滑筋を過分極させる因子が、EDHF (endothelium-derived hyperpolarization factor)と理解されているが、その本態については、完全には、分かっていない。図表に示した機序は、内皮細胞から遊離した過酸化水素が、平滑筋細胞のK_{Ca}チャンネルを活性化し、過分極させ弛緩させる機序を示している。この他、内皮細胞の過分極は、内皮と平滑筋を連結しているギャップジャンクションを介して、電気的な情報伝達の結果、平滑筋を過分極させる機序が考えられている。

図 5

腸間膜動脈弛緩作用



ケルセチンの血管弛緩作用 ケルセチンは、NE (1 μM) で収縮した血管を、用量依存性に弛緩させた。

表2 ケルセチンのラット腸間膜動脈弛緩作用

	Quercetin (μM)							
	N	0.1	0.3	1.0	3.0	10	30	100
Control	10	1.6 \pm 0.94	8.0 \pm 1.7 ³⁾	23.4 \pm 3.2 ³⁾	33.9 \pm 2.7 ³⁾	55.0 \pm 3.2 ³⁾	69.8 \pm 3.4 ³⁾	99.6 \pm 3.0 ³⁾
L-NAME (100 μM)	8	1.3 \pm 0.9	3.2 \pm 1.8	19.2 \pm 3.4 ²⁾	31.0 \pm 2.8 ²⁾	51.2 \pm 2.0 ³⁾	62.3 \pm 4.7 ³⁾	86.6 \pm 7.0 ^{3a)}
L-NAME+Indomethacin (10 μM)	8	1.9 \pm 0.75	4.1 \pm 1.3	19.0 \pm 7.3 ²⁾	31.2 \pm 6.3 ²⁾	52.5 \pm 7.8 ³⁾	63.2 \pm 6.9 ³⁾	82.0 \pm 2.2 ^{3a)}
L-NAME+Indomethacin+TEA (100 μM)	6	1.3 \pm 0.80	7.5 \pm 2.9	20.2 \pm 5.7 ²⁾	31.2 \pm 6.3 ²⁾	52.5 \pm 7.6 ³⁾	67.8 \pm 2.4 ³⁾	82.0 \pm 2.4 ^{3a)}
Endothelium denuded	6	1.8 \pm 0.55	3.8 \pm 1.6 ^{b)}	8.5 \pm 1.9 ^{1b)}	13.0 \pm 2.6 ^{3b)}	30.8 \pm 4.9 ^{2b)}	44.2 \pm 4.2 ^{3b)}	56.6 \pm 10.5 ^{3b)}

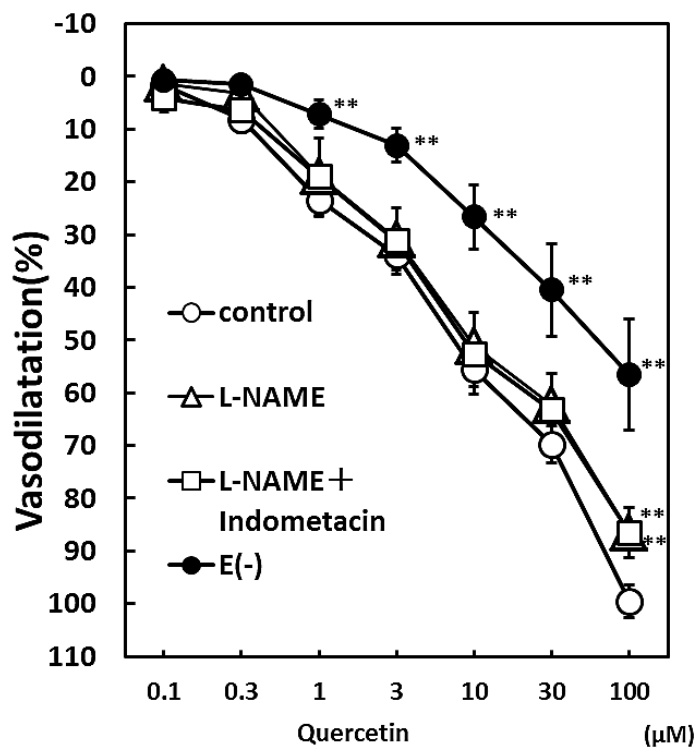
数値 (%) は、標準誤差とともに示されている。

1, a *: $p < 0.05$, 2, b: $p < 0.01$, 3: $p < 0.001$ をそれぞれ示す。

1, 2, 3 は、各数値が、血管の NE による最大収縮時と比較してケルセチンそのものが、どの程度弛緩させたかを、ケルセチンのコントロール内で比較した有意差を示す。

a および b は、ケルセチンコントロールに対して、各条件下での弛緩作用を比較し、有意差があるかを示したものである。

図6 ケルセチンによる血管内皮依存性弛緩作用 -腸間膜動脈- (1)

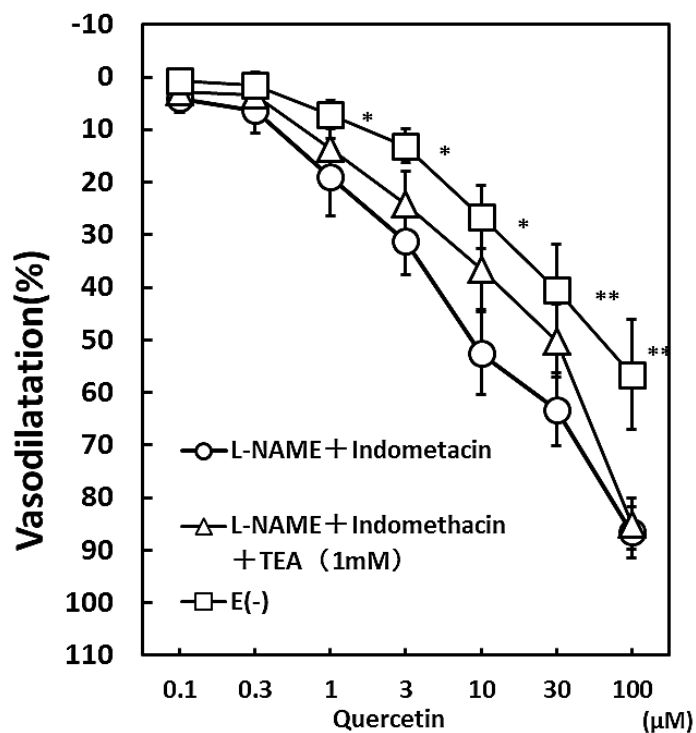


腸間膜動脈における用量依存性ケルセチン血管弛緩作用。ケルセチンの血管弛緩作用は、L-NAME (100 μM) の前投与で減弱を認めたが、わずかな影響であった。L-NAME +インドメタシン (10 μM) の投与で、血管弛緩作用の減弱を認めたが、L-NAME 単独投与と変化なかった。血管内皮除去で、強い弛緩作用の減弱を認めた。

○コントロール (n = 10)、△ L-NAME 前投与 (n = 8)、□ L-NAME+インドメタシン前投与 (n=8)、● (n=6) 血管内皮除去。数値 (%) は、標準誤差とともに表示。

**は、p < 0.01。コントロールと比較した有意差を示す。

図7 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用（2）-腸間膜動脈-



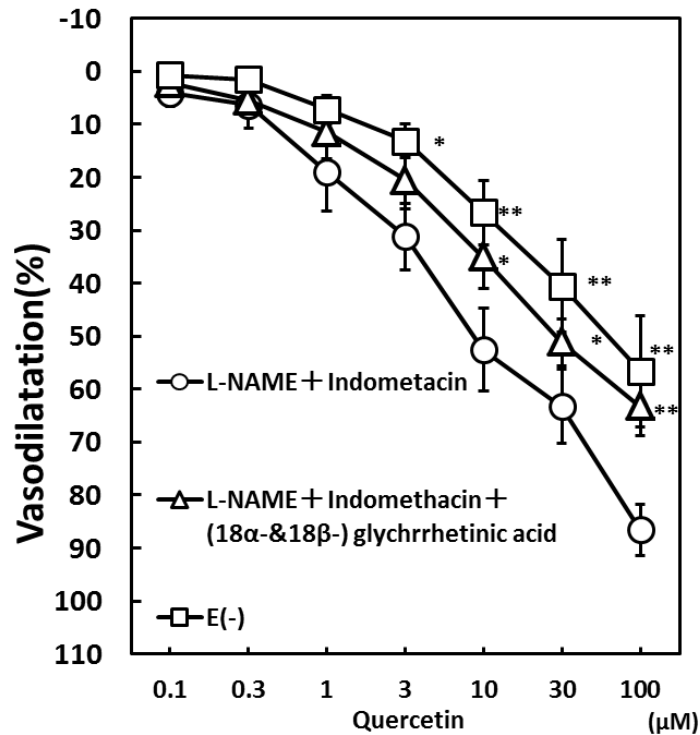
NO およびプロスタノイド関与しない血管弛緩作用に対する TEA の影響。

L-NAME およびプロスタノイドが関与しない血管弛緩作用に、さらに TEA (1 mM) の前投与が追加されても、有意差変化は、みられなかった。

○L-NAME とインドメサシン前投与 (n = 8)、△L-NAME+インドメサシン+TEA (1 mM) (n = 8)、□血管内皮除去 (n = 6)。

* : p<0.05、** : p<0.01 : 有意差は、L-NAME+インドメサシン前投与と比較。

図 8 ケルセチン血管内皮依存性弛緩作用の変化 (3) -腸間膜動脈-



NO およびプロスタノイドが関与しない血管弛緩作用におけるギャップジャンクションの影響。

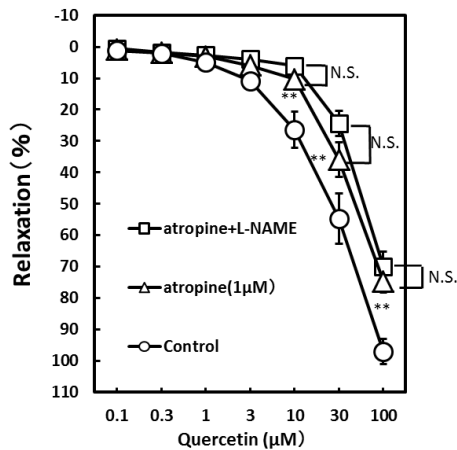
L-NAME およびインドメタシン抵抗性の血管弛緩作用が、さらに 18α-glycyrrhethinic acid (100 μM) と 18β-glycyrrhethinic acid (50 μM) の影響を受けるかを検討した。ギャップジャンクション阻害薬である 18α-と 18β-glycyrrhethinic acid の前投与を追加すると、有意に血管弛緩作用は減弱し、ギャップジャンクションの関与が考えられた。血管内皮除去した状態と比較すると、ほぼ同程度の減弱で有意な差はみられなかった。

○ : L-NAME + インドメサシン (n = 8)、△ : L-NAME + インドメサシン + (18α & β) glycyrrhethinic acid (n = 9)、□ : 血管内皮除去 (n = 6)。

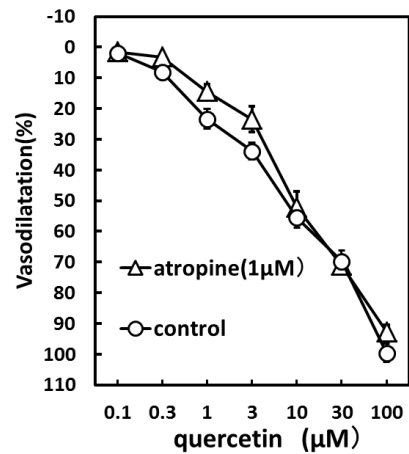
* : p < 0.05, ** : p < 0.01 : 有意差は、L-NAME + インドメサシン前投与と比較して判定した。

図9 ケルセチンの血管内皮依存性弛緩作用におけるムスカリン受容体の関与

A ラット大動脈



B ラット腸間膜動脈



A ラット大動脈

○ : コントロール (n = 10)、△ : アトロピン (1 μM) (n = 6)、□ : アトロピン + LNAME (100 μM) (n = 6)

アトロピン (1 μM) にて、ケルセチンの弛緩作用は減弱したため、ケルセチンは、ムスカリン受容体を介して、弛緩作用をしていることがわかる。L-NAME を追加しても、さらに弛緩作用が減弱する現象は、みられなかった。

** : p < 0.05, N.S. : not significant

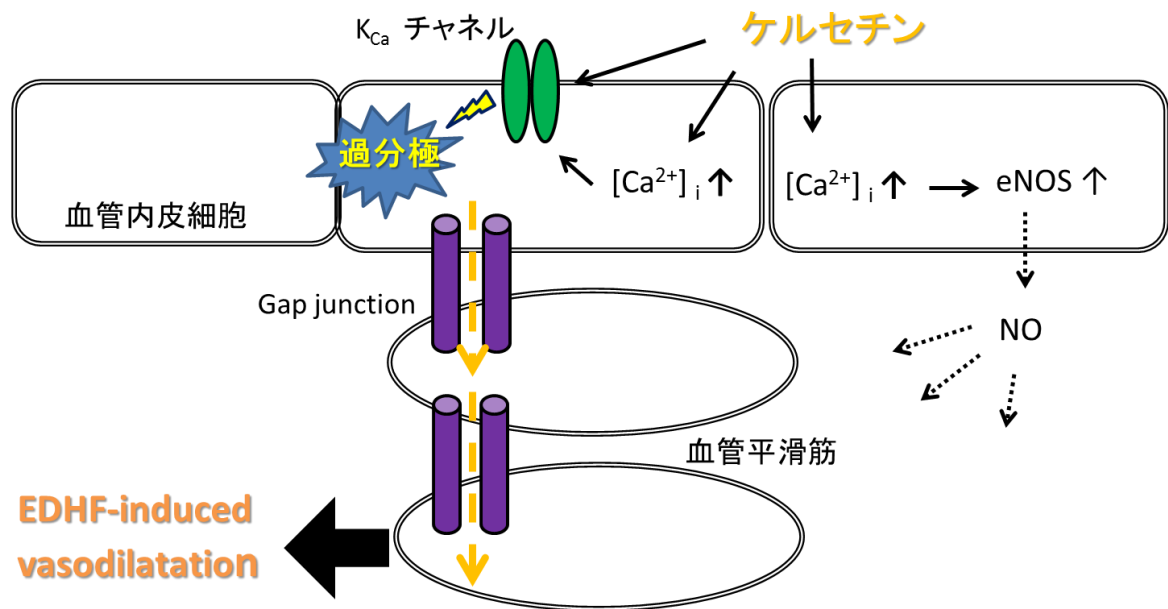
B ラット腸間膜動脈

○ : コントロール (n = 10)、△ : アトロピン (1 μM) (n = 6)

ラット腸間膜動脈では、アトロピン (1 μM) で、弛緩作用が減弱する現象は、みられなかった。

(unpublished data)

図10 ケルセチンによる血管弛緩作用機序まとめ（ラット腸間膜動脈における）



8. 文献

- 1) Salvamani S, Gunasekaran B, Shaharuddin NA, Ahmad SA, Shukor MY. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *Biomed Res Int*. 2014; Article ID. 480258.
- 2) Hertog MGL, Hertog MG1, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer*. 1993; 20: 21-29.
- 3) Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, Katan MB. Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *J Am Diet Assoc*. 2002;102:1414-1420.
- 4) Zhang Y, Li Y, Cao C, Chen W, Zhang Y, Wang J, Zhang X, Zhao X. Dietary flavonol and Flavone intakes and their major food sources in Chinese adults. *Nutr Cancer*. 2010; 62:1120-1127.
- 5) Nishida S, Satoh H. Comparative vasodilating actions among terpenoids and flavonoids contained in Ginkgo biloba extract. *Clin Chim Acta*. 2004; 339(1-2):129-133.
- 6) Kang W, Wang J: In vitro antioxidant properties and in vitro lowering blood lipid of Forsythia suspense leaves. *Med Chem Res*. 2010; 19: 617-628.
- 7) Wu LY, Gao HZ, Wang XL et al: Analysis of chemical composition of chrysanthemum indicum flowers by GC/MS and HPLC. *J Med Plants Res*. 2010; 4:421-426.
- 8) 伊藤 宏、中島嘉次郎、新甫勇次郎：茴香の科学と薬理：現代東洋医学 9：57-63, 1988.

- 9) 刈米 達夫：「最新生薬学」，廣川書店，東京，255－256，1982.
- 10) 上海科学技术出版社、「中薬大辞典」小学館 1985.
- 11) Neuhouser ML. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutr Cancer*. 2004; 50:1-7.
- 12) Ekrtrom AM, Serafini M, Nyren O, Wolk A, Bosetti C, Bellocco R. Dietary quercetin intake and risk of gastric cancer: results from a population-based study in Sweden. *Ann Oncol*. 2011; 22:438-443.
- 13) Djuric Z, Severson RK, Kato I. Association of Dietary Quercetin with Reduced Risk of Proximal Colon Cancer. *Nutr Cancer*. 2012; 64:351-360.
- 14) Gibellini L, Pinti M, Nasi M, Montagna JP, Biasi SD, Roat E, Bertoncetti L, Cooper EL, Cossarizza A. Quercetin and Cancer Chemoprevention. *eCAM*. 2011; Article ID 591356.
- 15) Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Mahonen M, Tolonen H, Ruokokoski E, Amouyel P. Contribution of trends in survival and coronary-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA project populations. Monitoring trends and determinants in cardiovascular disease. *Lancet*. 1999; 353:1547-1557.
- 16) Stoclet JC, Chataignesu T, Mamadou N, Oak MH, Bedoui JE, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol*. 2004;500:299-313.
- 17) Hertrog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993; 342:1007-1011.
- 18) Geleijnse JM, Launer LJ, Van der Kuip DA, Hofman A, Witteman JC. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial

- infarction: the Rotterdam Study. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 560-568.
- 19) Josipura KJ, Hu FB, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Golditz G, Ascherio A, Rosner B, Spiegelman D. The effects of fruits and vegetables intake on risk for coronary heart disease. *Ann Intern Med.* 2001; 134: 1106-1114.
- 20) Macready A L, George TW, Chong MF, Alimbetov DS, Jin Y, Vidal A, Spencer JPE, Kennedy OB, Minihane AM, Gordon MH, Lovegrove JA. Flavanoid-rich fruit and vegetables improve microvascular reactivity and inflammatory status in men at risk of cardiovascular disease-FLAVURS: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2014; 99: 479-489.
- 21) Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Symons JD, Jalili T. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. 2007. *J. Nutr.* 137:2405-2411.
- 22) Larson AJ, Symons JD, Jalili T. Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanism. *Adv Nutr.* 2012; 3: 39-46.
- 23) Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, Oute MA, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin on spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 2001; 133: 117-124.
- 24) Jacobs H, Mohamed M, Bast A, Vijgh WJF, Haenen GRMM. An essential difference between the flavonoids MonoHER and quercetin in their interplay with the endogenous antioxidant network. *PLoS One.* 2010; 5: e13880
- 25) Leiberer A, Mündlein A, Drexel H. Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vascul Pharmacol.* 2013; 58: 3-20.
- 26) Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, Van Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and

- anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis*. 2011; 218: 44-52.
- 27) Duarte J, Pérez-Vizcaíno F, Zarzuelo A, Jiménez J, Tamargo J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 1993; 239:1-7.
- 28) Pérez-Vizcaíno F, Ibarra M, Cogolludo AL, Duarte J, Zaragoza-Arnáez F, Moreno L, López-López G, Tamargo J. Endothelium-independent vasodilator effects of the flavonoid quercetin and its methylated metabolites in rat conductance and resistance arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302: 66-72.
- 29) Guerrero L, Castillo J, Quiñones M, Garcia-Vallvé S, Arola L, Pujadas G, Muguerza B. Inhibition of angiotensin-converting enzyme activity by flavonoids: structure-activity relationship studies. *PLoS ONE*. 2012; 7: e49493.
- 30) Nishida S, Satoh H. Possible involvement of Ca activated K channels, SK channel, in the quercetin-Induced vasodilatation. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2009; 13: 361-365.
- 31) Nishida S, Satoh H: Vasorelaxation mechanisms of quercetin in rat arteries. *J US-China Med Sci*. 2009;6:54-61.
- 32) Saponara S, Sqaraqil G, Fusi F. Quercetin as a novel activator of L-type Ca(2+) channels in rat tail artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2002;135: 1819-1827.
- 33) Satoh H and Nishida S. *Clin Chim Acta*. 2004; 342:13-22.
- 34) Saponara S, Sgaragli G, Fusi F. Quercetin antagonism of Bay K 8644 effects on rat tail artery L-type Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol*. 2008;

598:75–80.

- 35) Duarte J, Vizcaino FP, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure–activity relationship. *Gen Pharmacol.* 1993; 24:857–862.
- 36) Iozzi D, Schubert R, Kalenchuk VU, Neri A, Sgaragli G, Fusi F, Saponara S. Quercetin relaxes rat tail main artery partly via a PKG-mediated stimulation of KCa 1.1 channels. *Acta Physiol (Oxf).* 2013; 208:329–339.
- 37) Cogolludo A, Frazziano G, Briones AM, Cobeno L, Moreno L, Lodi F, Salaices m, Tamargo J, Perez–Vizcaino F. The dietary flavonoid quercetin activates BKCa currents in coronary arteries via production H₂O₂. Role in vasodilatation. *Cardiovasc Res.* 2007;73:424–431.
- 38) Woodman OL, Wongsawakul O, Sobey CG. Contribution of nitric oxide, cyclic GMP and K⁺ channels to acetylcholine-induced dilatation of rat conduit and resistant arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27:34–40.
- 39) Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature.* 1998; 396: 269–272
- 40) Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1521–1530.
- 41) Hill CE, Hickey H, Sandow SL. Role of gap junctions in acetylcholine-induced vasodilatation of proximal and distal arteries of the rat mesentery.

- J Auton Nerv Syst. 2000; 81:122-127.
- 42) Mather S, Dora KA, Sandoe SL, Winter P, Garland CJ. Rapid endothelial cell-selective loading of connexin 40 antibody blockes endothelium-derived hyperpolarizing factor dilation in rat small mesenteric arteries. *Circ Res* . 2005; 97:399-407.
- 43) Edwards G, Thollon C, Gardner MJ, Feletou M, Vilaine J, Vanhoutte PM, Weston AH. Role of gap junctions and EETs in endothelium-derived hyperpolarization of porcine coronary artery. *Br J pharmacol.* 2000;129:1145-1154
- 44) 鈴木 光. 内皮細胞依存性過分極因子 (EDHF) 研究の最近の進展. *日薬雑誌.* 2003;121:85-90.
- 45) Mayer B, Schmidt K, Humbert P, Bohme E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 164:678-685.
- 46) Busse R, Fichtner H, Luckhoff A, Kohlhardt M. Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol.* 1988; 255: H965-969
- 47) Chen GF, Suzuki H. Calcium dependency of the endothelium-dependent hyperpolarization in smooth muscle cells of the rabbit carotid artery. *J Physiol.* 1990; 421, 521-534.
- 48) Fukao M, Hattori Y, Kanno M, Sakuma I, Kitabatake A. Sources of Ca^{2+} in relation to generation of acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in rat mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1997;

120:1328-1334

- 49) Félétou M, Vanhoutte PM. The Alternative: EDHF. *J Mol Cell Cardiol.* 2002. 31:15-22
- 50) Kubota Y, Tanaka T, Umegaki K. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level. *Life Sci.* 2001; 69: 2327-2336.
- 51) Khoo NKH, White CR, Pozzo-Miller L, Zhou F, Constance C, Inoue T, Patel RP, Parks DA. Dietary flavonoid quercetin stimulates vasorelaxation in aortic vessels. *Free radic Biol Med.* 2010; 49: 339-347.
- 52) White R, Hiley CR. A comparison of EDHF-mediated and anandamide-induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol.* 1997; 122: 1573-1584.
- 53) Kuhlmann CR, Schaefer CA, Kosok C, Abdallah Y, Walther S, Lüdders DW, Neumann T, Tillmanns H, Schäfer C, Piper HM, Erdogan A. Quercetin-induced vasodilatation of the NO/cGMP pathway depends on Ca²⁺-activated K⁺ channel-induced hyperpolarization-mediated Ca²⁺ entry into cultured human endothelial cells. *Planta Med.* 2005; 6: 520-524.
- 54) Erlund I, Silaste ML, Alfthan G, Rantala M, Kesäniemi YA, Aro A. Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: 891-898.
- 55) Kaushik D, O'Fallon K, Clarkson PM, Patrick Dunne C, Conca KR, Michniak-Kohn B. Comparison of Quercetin Pharmacokinetics Following Oral Supplementation in Humans. *J Food Sci* 2012; 77: H231-238.

- 56) 松本 貴之 糖尿病性血管合併症における内皮由来過分極因子の重要性と治療戦略へのアプローチ。薬学雑誌. 2010; 130: 777-784.
- 57) Triggle CR1, Samuel SM, Ravishankar S, Marei I, Arunachalam G, Ding H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. Can J Physiol Pharmacol. 2012; 90: 713-738.
- 58) Machha AI, Achike FI, Mustafa AM, Mustafa MR. Quercetin, a flavonoid antioxidant, modulates endothelium-derived nitric oxide bioavailability in diabetic rat aortas. Nitric Oxide. 2007; 16: 442-447.