

1 型糖尿病・食塩負荷高血圧モデルラットを用いた循環器調節に関する研究

平原 康寿

福岡大学 薬学部 生体機能制御学教室
814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

Study on cardiovascular regulation in a high-sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats

Yasutoshi Hirabara

Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science,
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jyonanku, Fukuoka, 814-0180, Japan.

Abstract

In experimental diabetes, abnormalities of cardiovascular system are known to occur. In the present study, I examined that the vasoreactivity of the mesenteric artery and central cardiovascular regulation using streptozotocin (STZ) –induced diabetic rats with high sodium -loaded.

Diabetic rats were obtained by a single injection of STZ (60mg/kg) dissolved in 10mmol/L citrate buffer through the tail vein. Then, control and diabetic rats were given high sodium (8% NaCl diet and 1% NaCl drinking water) diet for 8weeks. (1) I prepared a specimen ring from mesenteric arteries and measured vasoreactivity. (2) Systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured weekly in conscious rats by a tail-cuff blood pressure analyzer. (3) Under anestherization, intravenous administration did phenylephrine and sodium nitroprusside (SNP) to evaluate baroreceptor reflex function to and index in alteration of HR for alteration of blood pressure.

(1) There was no change in vasoreactivity of the mesenteric artery in the diabetic rats. However, in the high sodium-loaded group, the endothelium-dependent relaxation by acetylcholine (ACh) was significantly attenuated, in addition, the endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF)-mediated relaxation was hardly observed. (2) There was no significant difference in SBP between control and STZ-induced diabetic rats, but SBP increased after a high sodium diet was given. (3) Diabetic rats kept the baroreceptor reflex function, but the baroreceptor reflex sensitivity was significantly

attenuated in the high sodium loaded group.

〔緒言〕

日本では、食の欧米化や急速な高齢化に伴い、生活習慣病といわれる糖尿病や循環器疾患は爆発的に増加しており、その適切な管理・治療が重要な課題となっている。中でも、糖尿病患者は増加の一途をたどり、厚生労働省が 2003 年に発表した糖尿病実態調査によると、糖尿病が強く疑われる人が約 740 万人、可能性を否定できない人が約 880 万人にも上ることが報告されている¹⁾。

糖尿病—diabetes mellitus (DM) は、ギリシャ語で「あふれるように尿が出る」を表す diabetes と、ラテン語で「蜂蜜」を表す mellit からなり、「インスリンの作用不足による糖代謝異常により引き起こる慢性的な高血糖状態」と定義されている。臨床の場において、空腹時血糖値 110 mg/dL、ヘモグロビン A1c 5.8%以上を糖尿病と診断している。糖尿病は、若年者に好発しインスリン分泌が先天的に低下している1型糖尿病と、インスリン抵抗性などインスリンの作用低下が原因の2型糖尿病に分類される。また、その病態を研究するための各種の糖尿病モデル動物が開発・作製されている (Table 1)。

Table 1 糖尿病の分類とモデル動物

タイプ	特徴	モデル動物
1型	インスリン依存性 (IDDM) インスリンの分泌低下	Streptozotocin-induced rat/mouse
2型	インスリン非依存性 (NIDDM) インスリンの作用・感受性・抵抗低下	Goto-Kakizaki (GK) rat Zucker rat, etc.

糖尿病の合併症として、「網膜症」、「末梢神経障害」、「腎症」の三つが広く知られている。末梢神経障害に関し、私は、streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスを使い糖尿病による神経因性疼痛について報告している²⁾。これら合併症の主な原因に、微小血管障害が考えられている。この血管障害が引き金となり、脳梗塞、虚血性心疾患のような大血管障害へと進行する。このように糖尿病と血管障害は密接な関係があり、糖尿病による微小血管障害の機序解明のためにこれまで多くの研究が行なわれている。

血管は弛緩と収縮とのバランスによって、その緊張性を調節・維持している。1998 年、Furchgott らは血管内皮細胞から産生される血管弛緩因子 (endothelium-derived relaxing factor; EDRF) の存在と、その本体が一酸化窒素 (NO) であることを突き止め、その功績に対しノーベル医学生理学賞が授与された。この NO は血管内皮細胞

内で NO 合成酵素 (eNOS) により産生され、血管平滑筋細胞に拡散し、cyclic GMP 合成酵素に結合し、この酵素を活性化させる。血管の弛緩は、cyclic GMP 濃度の上昇により引き起こされる。その後、protein kinase G が活性化され、細胞外へ Ca^{2+} が流出する。続いて、カリウムチャンネルをリン酸化させ開口し、細胞外へ K^+ の流出が生じ膜の過分極が起こる。その結果、膜電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが閉口し細胞内への Ca^{2+} の流入が抑制される。以上のメカニズムにより、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下することで弛緩反応が起こると考えられている。

近年、NO 以外にも細胞膜の過分極により血管平滑筋が弛緩することが明らかにされ、血管内皮由来の過分極因子 (endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) の存在が提唱されてきた。特に、細い血管になるほど血管弛緩における EDHF の寄与は NO よりも大きくなると言われている^{3, 4)}。この点は、以前からニトロ剤が太い血管の冠動脈にしか作用せず、細い血管には作用しにくいことが知られており、NO 以外の弛緩因子の存在を裏付けている。しかしながら臨床や研究において、用いる血管の種類や動物種によっても結果が異なるため、EDHF の本体については未だ明らかにされていない。

EDHF は NO と同様、 Ca^{2+} /Calmodulin 依存的に血管内皮細胞内で産生、遊離され、血管平滑筋の K^+ チャンネルを開口することによって、血管を弛緩すると考えられている。NO は NOS によりアルギニンから産生されるが、アルギニンや NOS の補酵素が存在しない状態では、EDHF が NO に代わって血管弛緩を起こすことが知られており、EDHF と NO は補完的に作用しあっていると考えられている。1980 年代後半に EDRF が NO そのものであることが実証され、その後も NO に関する研究は飛躍的に発展したのとは対照的に、EDHF は同時期にその存在が提唱されてにもかかわらず、今なお同定されていない⁴⁾。これまでに幾つかの EDHF 候補分子が報告されており、Busse ら^{5, 6)} はアラキドン酸カスケード中の cytochrome P450 monooxygenase により産生される epoxyeicosatrienoic acids が EDHF の本体であると主張している。また、Edwards ら⁷⁾ はラットの肝動脈ではカリウムイオンがその本体であるとし、Shimokawa ら^{8, 9)} は活性酸素の一種である過酸化水素がその本体であると結論している。さらには、そのような血管内皮細胞由来因子は存在せず、血管内皮と血管平滑筋との gap junction を介して過分極が伝播するという説もある^{10, 11)}。

このような血管収縮・弛緩のメカニズムの研究成績に基づいて、糖尿病による血管障害の研究も行なわれてきた。その多くの研究は、糖尿病の動物モデルを使用している。例えば、1 型糖尿病モデル動物を使った acetylcholine (ACh) の弛緩反応について、Fukao ら¹²⁾ や Poston ら¹³⁾ は弛緩反応が減弱すると報告している。一方、Harris ら¹⁴⁾ や Mulhern ら¹⁵⁾ によると弛緩反応は正常であるとの報告もある。最近、Makino ら¹⁶⁾ や Wigg ら¹⁷⁾ によって 1 型糖尿病モデルラットの腸間膜動脈を用いた EDHF を介する血管弛緩反応について報告された。このように、糖尿病でおこる合併症の発症原因の

一つに、抵抗血管のような微小血管の障害が考えられている。

一方、糖尿病との合併症において高頻度に発症する病態として高血圧症がある。その中でも、食塩の過剰摂取が引き起こす「食塩感受性高血圧」は私たちの生活と密接に関係する。食塩摂取による高血圧発症の原因として、体内 Na^+ 増加に伴う循環血流量(体液量)の増加がある。また、血圧調節に関わる体液量調節機構には、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が深く関与しており、臨床においてもアンジオテンシン受容体拮抗薬が降圧薬として広く使われている。Cheng ら^{18, 19)} は2型糖尿病モデルラットに高食塩を負荷することで EDHF を介する血管弛緩反応および循環器反応が悪化すると報告している。しかしながら、これら血管障害やそれに伴う循環器障害の詳細については未だ解明されていない。

本研究では、糖尿病と高血圧症単独および高血圧を合併した糖尿病における血管内皮細胞障害による血管運動、それら病態時の循環器調節機構について解明するために、1型糖尿病、食塩負荷による高血圧症およびその高血圧症を合併した1型糖尿病の3つの病態モデル動物を作製し検討を行なった。はじめに、腸間膜動脈を用い、血管の収縮・弛緩反応について検討した。次に、末梢の循環器調節機構について経日的血圧・心拍数の変化を調べた。また中枢性の循環器調節機構について動脈圧受容器反射を指標に検討し、さらに中枢性循環器調節における aldosterone の役割を検討した。

〔実験方法〕

実験には Wistar 系雄性ラットを用いた。膵臓 β 細胞を特異的に破壊する streptozotocin (STZ; 60 mg/kg) を尾静脈内に単回投与し、血液中グルコース濃度 300 mg/dL 以上を糖尿病モデルとした。対照群として、vehicle (citrate buffer) を同様に投与した。実験には、薬物投与後 6, 12 週目のラットを使用した〔control 群, STZ 群〕。また、STZ および vehicle 投与後 4 週目のラットに、8%食塩食および1%の食塩水を 8 週間負荷した。実験には、高食塩負荷後 2 週目(糖尿病モデル 6 週目)、8 週目(糖尿病モデル 12 週目)のラットを使用した〔high sodium 群, STZ-high sodium 群〕。さらに、レニン-アンジオテンシン系の関与を調べるために AT1 受容体拮抗薬の losartan (50 mg/kg) を食塩負荷と同時期に経口投与した。

①血管の収縮および弛緩反応は、ラットの腸間膜動脈を摘出後、リング標本を作製し、マグヌス法により測定した。EDHF を介する弛緩反応を検討する際は、N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) と indometacin を混合した栄養液を用いた。②血圧および心拍数の測定は、STZ 投与から3ヶ月間、食塩負荷、losartan 投与後2ヶ月間の収縮期血圧および心拍数を非観血的に測定した。③動脈圧受容器反射はウレタン麻酔下のラットを用い、phenylephrine および sodium nitroprusside (SNP) を静脈内投与し、血圧の変化に対する心拍数の変化を指標に評価した。

〔結果・考察〕

①摘出腸間膜動脈の血管運動機能

STZ 誘発 1 型糖尿病モデルラット (STZ 群) および高食塩負荷による高血圧モデルラット腸間膜動脈 (high sodium 群, STZ-high sodium 群) の収縮, 弛緩反応の変化について調べた。STZ 群において, α_1 受容体作動薬である phenylephrine による血管収縮 (Fig. 1A), acetylcholine による血管内皮由来弛緩反応 (Fig. 1B) に差は見られず, 長期週齢においても変化はなかった。この結果から, 糖尿病時における腸間膜動脈の血管運動機能は比較的維持していることが示唆された。しかし, 高食塩負荷により収縮反応の増強と弛緩反応の減弱が見られた。また, この血管運動機能障害は糖尿病と高血圧合併時により強く現れた。

次に, 血管内皮由来弛緩因子の 1 つである EDHF に着目し, 血管運動機能の変化について調べた。acetylcholine の EDHF を介する血管弛緩反応は, STZ-high sodium 群において著しく減弱した (Fig. 2)。さらに, この血管運動機能障害とレニン-アンジオテンシン系の関係について検討した。AT1 受容体拮抗薬の losartan は, phenylephrine による血管収縮反応の増加, acetylcholine による血管弛緩反応の減弱, および EDHF を介する血管内皮由来弛緩反応の減弱をそれぞれ改善した (Fig. 2)。

高血圧時の血管では, 内皮依存性弛緩反応の障害が起こり, また刺激薬などによる血管平滑筋の収縮が亢進していることが知られている²⁰⁾。この内皮依存性弛緩反応の障害の機序としては, 1) 内皮由来弛緩因子の遊離減少, 2) 内皮由来収縮因子の遊離増加, 3) 内皮由来過分極因子の遊離減少などが考えられている。今回, 高食塩負荷により血管運動機能障害が引き起こされており, その障害の形成に EDHF を介する血管弛緩反応の減弱が起きていることが示唆された。

②循環器機能の変化

STZ 群, high sodium 群および STZ-high sodium 群の収縮期血圧および心拍数を 3 ヶ月間測定した。12 週間の各モデルラットの収縮期血圧を Fig. 3A に, 心拍数を Fig. 4 に示した。収縮期血圧において, control 群と STZ 群に有意な差は見られなかった。しかし, 食塩を負荷することで食塩負荷後 1 週目から high sodium 群, STZ-high sodium 群の順に収縮期血圧は有意に上昇した (Fig. 3A)。これらの血圧上昇は, losartan の経口投与により抑制された (Fig. 3B)。一方, 心拍数では control 群に比べ, STZ 群において有意な心拍数の低下が見られた (Fig. 4A)。また, 食塩負荷両群に変化は見られなかった。食塩負荷両群に対し, losartan の経口投与による心拍数への影響はなかった (Fig. 4B)。

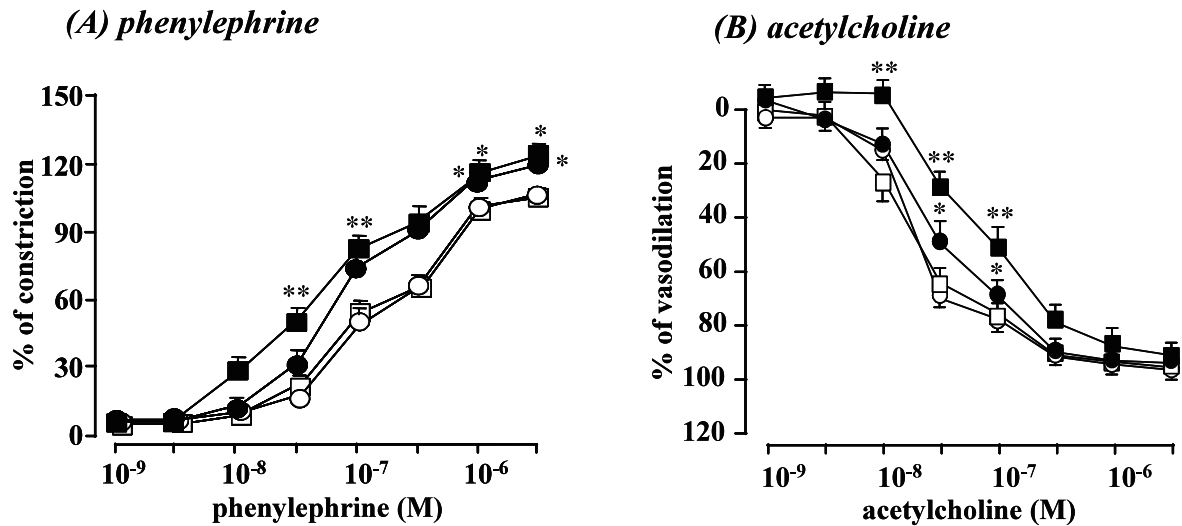


Fig. 1. Mesenteric arteries responses to (A) phenylephrine and (B) acetylcholine. ○; control. □; STZ, ●; high sodium, ■; STZ-high sodium. **P<0.01, *P<0.05 vs control.

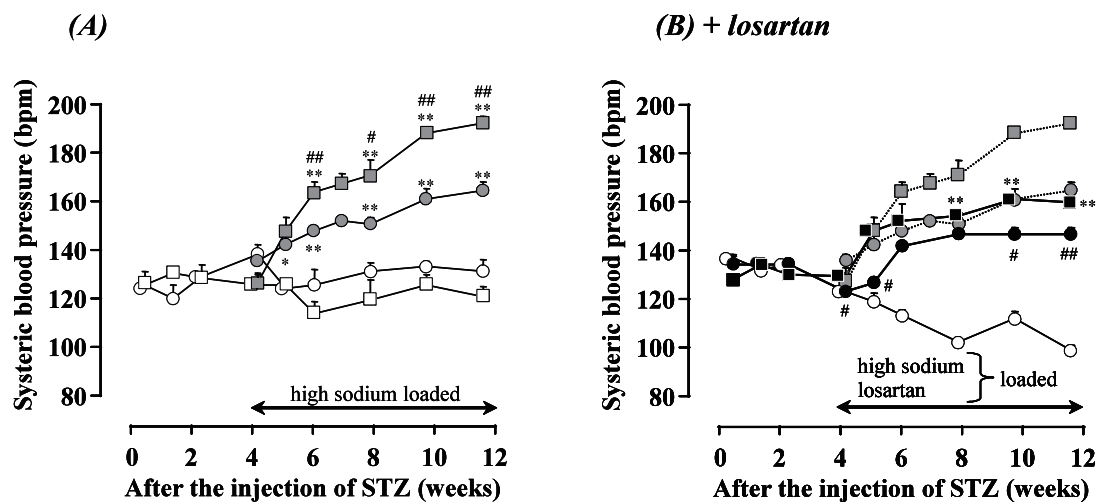
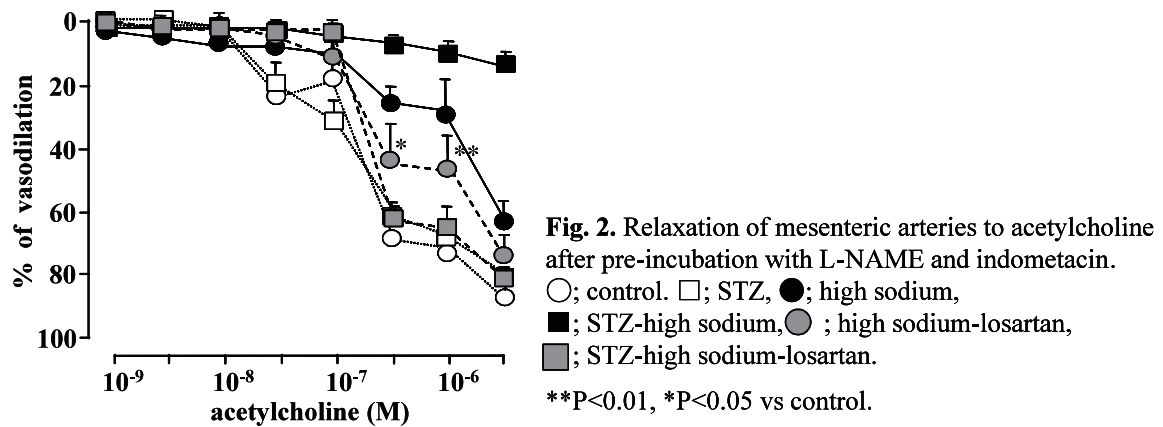


Fig. 3. Cardiovascular characteristics in systolic blood pressure (SBP). (A) STZ or high sodium groups (B) Losartan treated with high sodium groups. ○; control. □; STZ, ●; high sodium, ■; STZ-high sodium, ●; high sodium plus losartan, ■; STZ-high sodium plus losartan. (A) **P<0.01, *P<0.05 vs control, ##P<0.01, #P<0.05 vs high sodium, (B) ##P<0.01, #P<0.05 vs sodium loaded, **P<0.01, *P<0.05 vs STZ-sodium loaded.

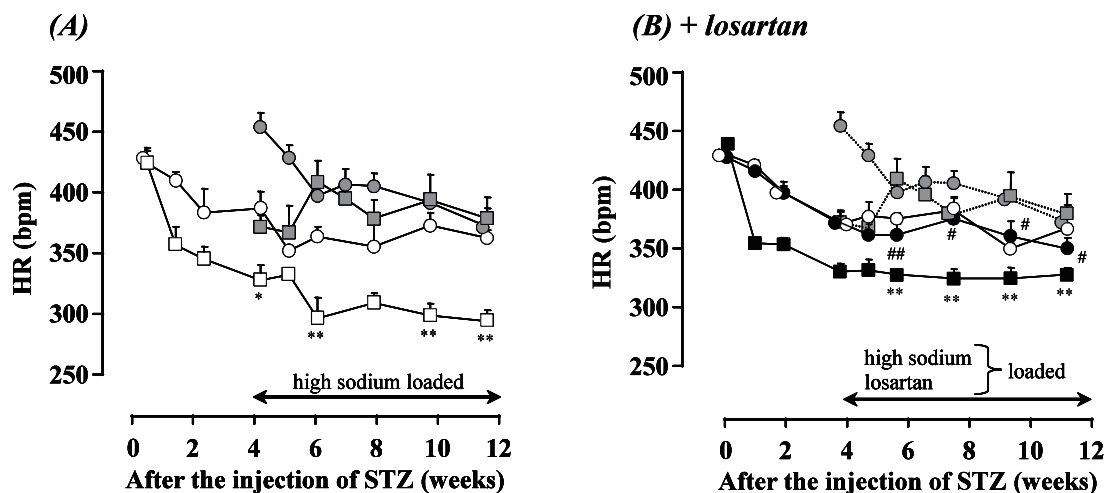


Fig. 4. Cardiovascular characteristics in heart rate (HR). (A) STZ or high sodium groups (B) losartan treated with high sodium groups. ○; control, □; STZ, ●; high sodium, ■; STZ-high sodium, ●; high sodium plus losartan, ■; STZ-high sodium plus losartan. (A) **P<0.01, *P<0.05 vs control, (B) ##P<0.01, #P<0.05 vs sodium loaded, **P<0.01, *P<0.05 vs STZ-sodium loaded.

③動脈圧受容器反射を指標とした中枢性循環器調節機構

STZ 群, high sodium 群および STZ-high sodium 群の動脈圧受容器反射の感受性を phenylephrine と SNP を投与し, 評価した。STZ 群において, 動脈圧受容器反射の感受性に変化は見られなかったが, 食塩負荷した両群では有意に低下した (Fig. 5)。

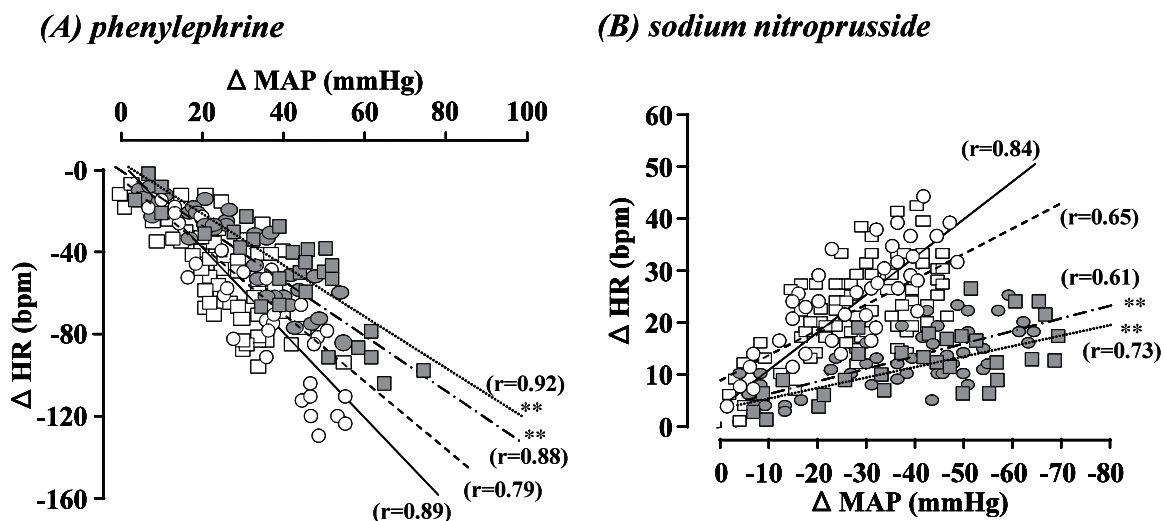


Fig. 5. Sensitivity of baroreceptor reflex to (A) phenylephrine and (B) sodium nitroprusside..
 —○— control, —□— STZ, —●— high sodium, —■— STZ-high sodium.
 *P<0.05, **P<0.01 vs control.

また、動脈圧受容器機構に対する aldosterone の中枢作用を検討するために、mineralcorticoid receptor (MR) 拮抗薬の spironolactone (1 μ g/10 μ L/min) を脳室内に前投与し、動脈圧受容器反射の感受性の変化を検討した。この spironolactone 投与を行うことは、食塩を負荷することで中枢での aldosterone の作用は減弱している状況と同じ状況であると考えられる。

実験の結果、spironolactone を脳室内に前投与した群では、vehicle を脳室内に前投与した群と比べて動脈圧受容器反射の有意な感受性の低下が見られた (Fig. 6)。

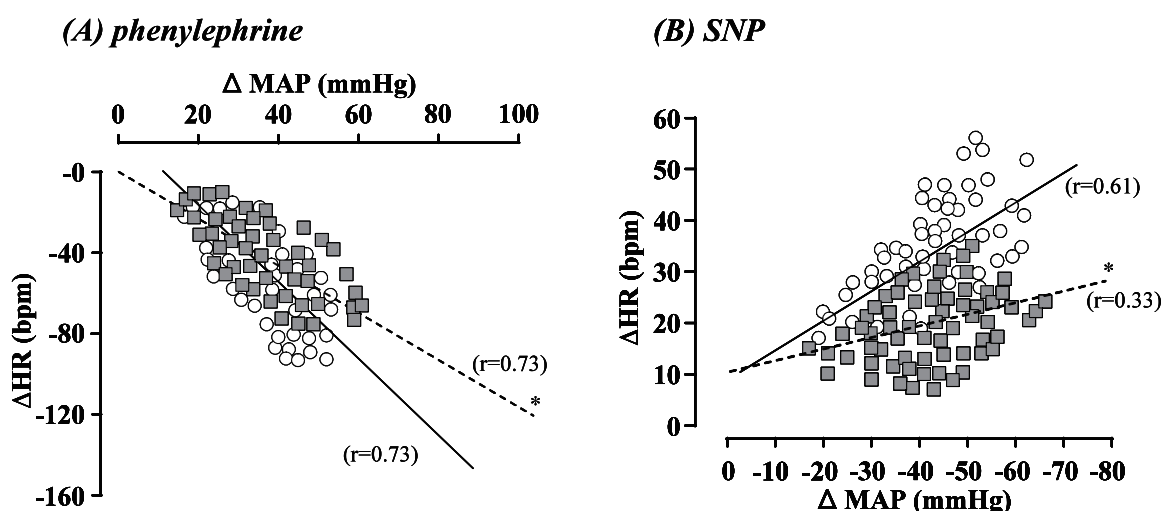


Fig. 6. Sensitivity of baroreceptor reflex to (A) phenylephrine, (B) sodium nitroprusside after the spironolactone i.c.v. injection. ○——; vehicle (n=7), ■-----; spironolactone (n=9). *P<0.05 vs vehicle.

〔総括〕

生活習慣病の代表とされる「糖尿病」の発症は、私たちの生活に重要な問題であり、脳血管障害や高血圧など疾患との合併症や、末梢神経障害による疼痛や脳機能障害による記憶の低下などは、社会的問題にもなりうる重篤な病態につながる。糖尿病で生じる合併症発症原因の一つに、抵抗血管のような微小血管の機能障害がある。さらに、私たちの身近な問題として食塩の過剰摂取による高血圧症があり、糖尿病の合併症において高頻度でおこる高血圧症は決して軽視できない問題である。そこで本論文では、1型糖尿病モデルラット (STZ 群)、高食塩負荷による高血圧モデルラット (high sodium 群) および高食塩負荷による高血圧を発症した1型糖尿病モデルラット (STZ-high sodium 群) を作製し、各病態時における末梢レベル (血管運動機能と血圧) と中枢レベル (動脈圧受容器反射) での循環器調節の変化を検討した。

はじめに、3つのモデルラットから摘出した腸間膜動脈の収縮および弛緩反応を調

べた。control 群と比べ STZ 群は長期にわたり血管運動機能は維持されていた。しかし、食塩を負荷した high sodium 群および STZ-high sodium 群では収縮反応の増加と弛緩反応の減弱が見られた。この弛緩反応の減弱は、血管内皮を介した弛緩反応の減弱が強く、血管内皮由来弛緩因子の中でも特に、EDHF の作用低下が起きていることが示唆された²¹⁾。また、STZ-high sodium 群で最も強く弛緩反応の減弱が見られたことから、糖尿病により血管内皮の障害が増強されていると考えられる。食塩を負荷した時の血管運動機能の障害は、AT1 受容体拮抗薬の losartan を投与することで改善された。以上より、糖尿病による血管運動機能は比較的維持していることが示唆された。しかし、食塩を負荷することで血管内皮を介する弛緩反応、特に EDHF の減弱が起こり、その減弱にはレニン-アンジオテンシン系が関与することが明らかとなった (Fig. 7)。

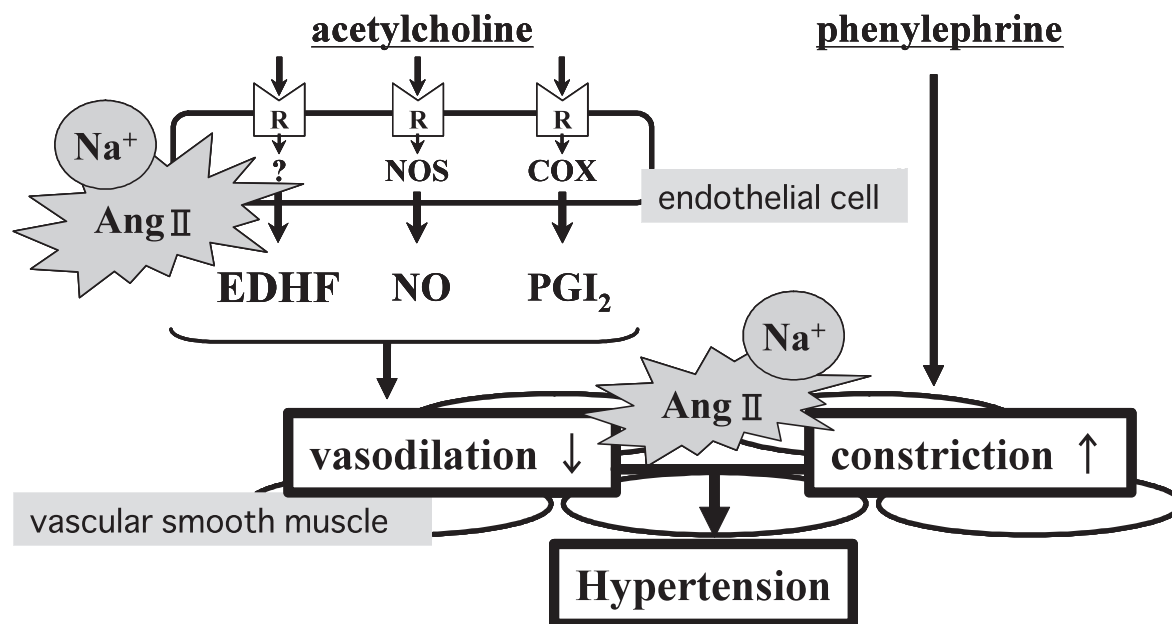
次に、STZ または vehicle 投与後 12 週間における control 群、STZ 群、high sodium 群および STZ-high sodium 群のラットの収縮期血圧と心拍数を調べた。control 群と比べ STZ 群では血圧に変化はなかったが、心拍数の低下が見られた。この時、STZ 群では心重量は増加しており心機能の低下が生じていると考えられる。食塩を負荷した high sodium 群および STZ-high sodium 群では血圧は有意に上昇した。これらの血圧の上昇は、AT1 受容体拮抗薬の losartan を投与することで改善された。また、食塩の負荷による血圧の上昇は high sodium 群、STZ-high sodium 群の順に上昇しており、腸管膜動脈の収縮弛緩反応において血管内皮を介する弛緩反応の減弱する順番と一致する点で非常に興味深い。つまり、血管内皮由来の弛緩反応の減弱が高血圧の発症に関与していることが示唆された。さらに、第二節において動脈圧受容器反射を調べたところ、control 群と比べ STZ 群では動脈圧受容器反射機構は比較的維持されていたが、食塩を負荷した high sodium 群および STZ-high sodium 群では動脈圧受容器反射の感受性の低下が見られた。これらのことから、糖尿病による循環器調節機構は末梢側および中枢側共に比較的維持していることが示唆された。しかし、食塩を負荷することで血圧の上昇や動脈圧受容器反射機構障害が生じることが明らかとなった (Fig. 8)。

さらに、食塩負荷による動脈圧受容器反射機構障害に関して、aldosterone の中枢性循環器調節機構への関与について検討した。延髄孤束核 (NTS) では、体内の塩分濃度に応じ 11 β -HSD2 神経を介して aldosterone の作用を調節し、体内塩分濃度の恒常性を維持している。食塩を過剰に摂取すると NTS では 11 β -HSD2 神経の抑制に伴い、aldosterone の作用が低下する。この時、動脈圧受容器反射反応は低下していた。そこで、正常なラットに MR 受容体拮抗薬の spironolactone を前投与し、動脈圧受容器反射反応を調べたところ、食塩を負荷したモデルラットと同様に動脈圧受容器反射反応は低下した。これらのことから、食塩の摂取による動脈圧受容器反射反

応の低下には、中枢での aldosterone の作用低下が関与することが示唆された。さらに、aldosterone の NTS への微量投与は血圧と心拍数を減少させた。この反応は NTS への情報伝達物質である L-glutamate の反応と類似しており、aldosterone が動脈圧受容器反射機構に関与している可能性が考えられた (Fig. 8)。

本研究は、(1) 1型糖尿病時での血管運動機能と末梢および中枢の循環器調節は、比較的維持されていることが明らかとなった。(2) 食塩を負荷することで、血管内皮由来の弛緩反応の減弱がおり、1型糖尿病を有する状態ではその減弱は悪化した。弛緩反応の減弱には、EDHF を介する内皮由来の弛緩因子の減弱が起きていることが示唆された。(3) 食塩を負荷した状態では、動脈圧受容器反射機構の低下が起こることが明らかとなり、脳内 aldosterone の作用低下が考えられた。さらに、延髄孤束核において、aldosterone は動脈圧受容器反射機構に関与する可能性が示唆された。

本研究では、1型糖尿病モデル動物を用いたが、臨床の間では2型糖尿病の患者が圧倒的に多い。今後は、2型糖尿病モデル動物や他の病態のモデル動物を使い、糖尿病を合併した時の循環器調節について研究を行なう必要がある。また、食塩の過剰摂取や高血圧を合併した糖尿病時において、血管内皮障害に関して EDHF の減弱が起きていることを明らかにしたことや、動脈圧受容器反射機構に aldosterone の関与の可能性が示唆されたことなどから、さらなる循環器調節機構の解明とそれに伴う新薬が開発されることを期待したい。



Ang II ; angiotensin II , COX; cyclooxygenase, NOS; nitric oxide synthases, EDHF; endothelium-derived hyperpolarizing factor

Fig. 7 The impairing mechanism of mesenteric artery response in diabetes and salt diet rats

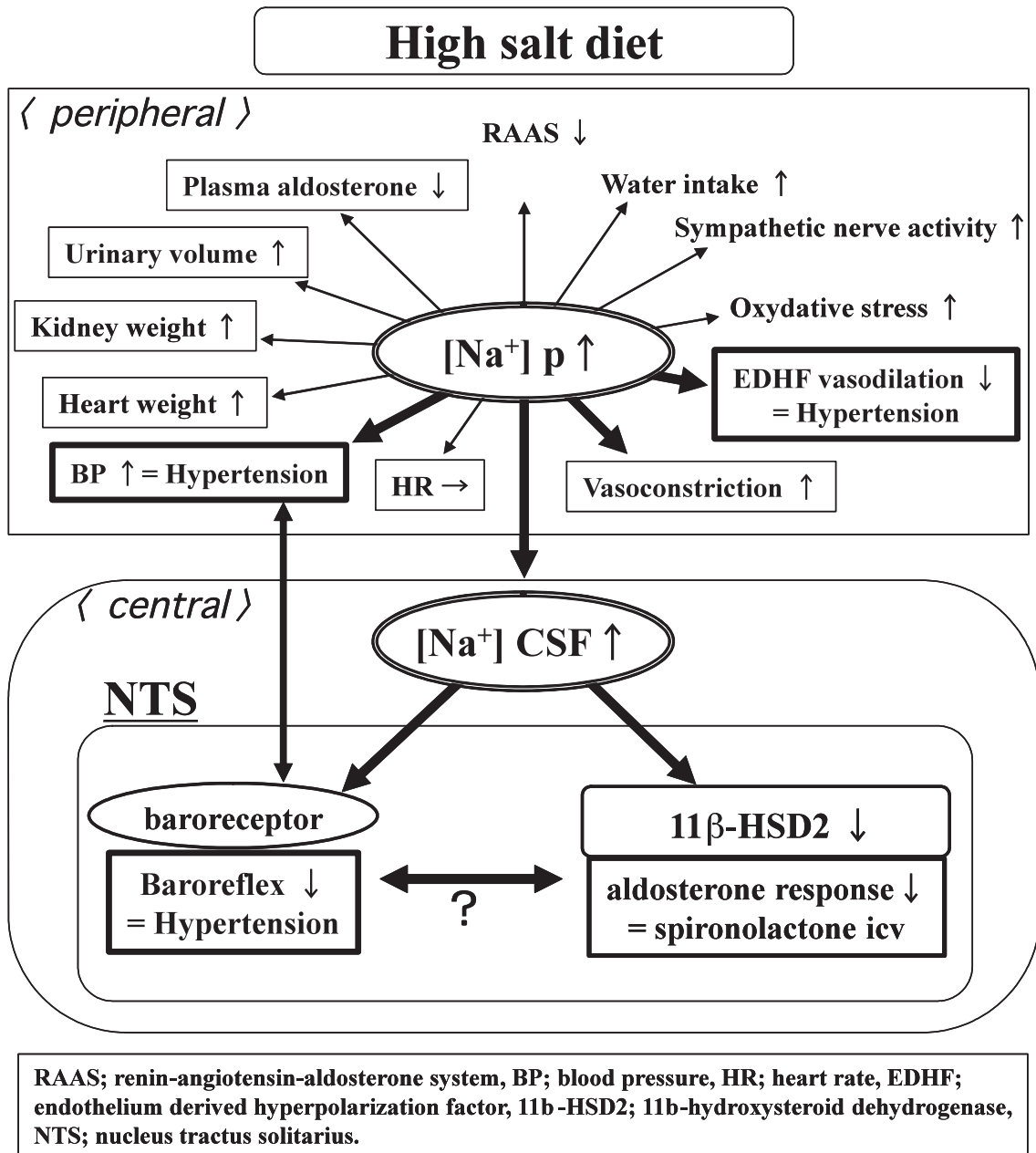


Fig. 8 Proposal mechanism of cardiovascular regulation in high salt diet

[参考文献]

1. Yamauchi, T. and Kadowaki, T.: Diabetes and the metabolic syndrome.; Nippon Yakurigaku Zasshi. 128, 133-140 (2006).
2. Koga, K., Honda, K., Ando, S., Harasawa, I., Kamiya, H. and Takano, Y.:

- Intrathecal clonidine inhibits mechanical allodynia via activation of the spinal muscarinic M1 receptor in streptozotocin-induced diabetic mice.; *Eur. J. Pharmacol.* 505, 75-82 (2004).
3. Chen, G., Suzuki, H. and Weston, A.H.: Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels.; *Br. J. Pharmacol.* 95, 1165–1174 (1988).
 4. Komori, K. and Vanhotte, P. M.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor.; *Blood Vessels.* 27, 238–245 (1990).
 5. Fisslthaler, B., Popp, R., Kiss, L., Potente, M., Harder, D.R., Fleming, I. and Busse, R.: Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries.; *Nature.* 401, 493-497 (1999).
 6. Fleming, I., Michaelis, U.R., Brendenkotter, D., Fisslthaler, B., Dehghani, F., Brandes, R.P. and Busse, R.: Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries.; *Circ. Res.* 88, 44-51 (2001).
 7. Edwards, G., Dora, K.A., Gardener, M.J., Garland, C.J. and Weston, A.H.: K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries.; *Nature.* 396, 269-272 (1998).
 8. Matoba, T., Shimokawa, H., Nakashima, M., Hirakawa, Y., Mukai, Y., Hirano, K., Kanaide, H. and Takeshita, A.: Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice.; *J. Clin. Invest.* 106, 1521-1530 (2000).
 9. Vanhoutte, P.M.: Endothelium-derived free radicals: for worse and for better.; *J. Clin. Invest.* 107, 23-25 (2001).
 10. Yamamoto, Y., Fukuta, H., Nakahira, Y. and Suzuki, H.: Blockade by 18β-glycyrrhetic acid of intercellular electrical coupling in guinea-pig arterioles.; *J. Physiol.* 511, 501-508 (1998).
 11. Edwards, G., Thollon, C., Gardener, M.J., Feletou, M., Vilaine, J.-P., Vanhoutte, P.M. and Weston, A.H.: Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery.; *Br. J. Pharmacol.* 129, 1145-1154 (2000).
 12. Fukao, M., Hattori, Y., Kanno, M., Sakuma, I. and Kitabatake, A.: Alteration in endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries from streptozotocin-induced diabetic rats.; *Br. J. Pharmacol.* 121, 1383-1391 (1997).
 13. Poston, L. and Taylor, P. D.: Endothelium-mediated vascular function in insulin-dependent diabetes mellitus.; *Clin. Sci.* 88, 245-255 (1995).

14. Harris, K. M. and Macleod, K. M.: Influence of the endothelium on contractile responses of arteries from diabetic rats.; *Eur. J. Pharmacol.* 153, 55-64 (1988).
15. Mulhern, M. and Docherty, J.R.: Effects of experimental diabetes on the responsiveness of rat aorta.; *Br. J. Pharmacol.* 97, 1007-1012 (1989).
16. Makino, A., Ohuchi, K. and Kamata, K.: Mechanisms underlying the attenuation of endothelium-dependent vasodilatation in the mesenteric arterial bed of the streptozotocin-induced diabetic rat.; *Br. J. Pharmacol.* 130, 549-556 (2000).
17. Wigg, S. J., Tare, M., Tonta, M. A., O'brien, R. C., Meredith, I. T. and Parkington, H. C.: Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and EDHF-independent artery.; *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281, H232-H240 (2001).
18. Cheng, Z.J., Vaskonen, T., Tikkanen, I., Nurminen, K., Ruskoaho, H., Vapaatalo, H., Muller, D., Park, J. K., Luft, F. C. and Mervaala, E.: Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats.; *Hypertension.* 37, 433-439 (2001).
19. Cheng, Z. J., Gronholm, T., Louhelainen, M., Finckenberg, P., Merasto, S., Tikkanen, I. and Mervaala, E.: Vascular and renal effects of vasopeptidase inhibition and angiotensin-converting enzyme blockade in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats.; *J. Hypertens.* 23, 1757-1770 (2005).
20. Sunano, S. and Sekiguchi, F.: Endothelium-derived factors in hypertensive blood vessels, especially nitric oxide and hypertension.; *Yakugaku Zasshi.* 123, 495-515 (2003).
21. Hirabara, Y., Araki, M., Fukuda, M., Katafuchi, S., Honda, K., Saito, R. and Takano, Y.: A high-sodium diet in streptozotocin-induced diabetic rats impairs endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation.; *J. Pharmacol. Sci.* 104, 402 – 405 (2007).