慢性腎不全患者での血漿中硫化水素濃度の測定

三橋 秀基^{1,2} 後藤 真弓^{1,2} 真下 啓一^{1,2} 重原 哲也^{1,2}
矢野 新太郎^{1,2}
上毛大橋クリニック¹ 群馬腎リウマチ研究所²

キーワード：硫化水素，透析，腎不全，血漿中濃度

〈要旨〉

危険な有毒ガスとして知られる硫化水素がヒト体内でもシステインから cystathionine β -synthase (CBS) や cystathionine γ lyase (CSE) により産生されることが知られている。この物質は神経伝達物質や血管作動性物質としての働きが認められ、第3のガス状メディエーターとして認識されつつある。しかし、血液中硫化水素の濃度測定は低濃度であり干渉する物質の存在のため難しく臨床的研究は数少ない。一方、腎不全では含硫アミノ酸代謝異常がおこりシステインや亜硫酸などの硫黄化合物が血中に上昇することが知られている。われわれは透析患者において硫化水素代謝異常の可能性を推測し、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) を用いた Savage 法にて日本人透析患者の血中硫化水素濃度を測定した。液中に添加された硫化水素を経時的に計測してみると、純水中や血漿中の硫化水素は経時的に減少した。血液中の硫化水素はそれらよりさらに急速に失われる傾向があることから、血中の硫化水素濃度測定には採血後に迅速な処理が必要であることが明らかとなった。血漿中の硫化水素濃度は透析患者においては正常者血中濃度よりも有意に上昇していた。さらに、血漿中硫化水素濃度は慢性糸球体腎炎群に比較して糖尿病群で有意に低かった。そして、単回の透析治療により透析前に上昇している血中硫化水素濃度は正常血清レベル以下まで低下した。また、透析治療中の透析排液中に硫化水素が検出された。これらのことから透析患者では硫化水素産生能亢進または消去能低下のため硫化水素が恒常的に血液中に増加しており透析により除去されることがわかった。

Plasma concentrations of hydrogen sulfide in patients with hemodialysis

Hideki Mitsuhashi^{1,2}, Mayumi Gotoh^{1,2}, Keiichi Mashimo^{1,2}, Tetsuya Shigehara^{1,2} and Shintaro Yano^{1,2}
Jomo Ohashi Clinic¹ and Gunma Research Center of Nephrology and Rheumatism²

Key words : hydrogen sulfide, hemodialysis, renal failure, plasma concentration

〈Abstract〉

In Japanese patients treated with hemodialysis, blood concentrations of sulfur-containing substances such as cysteine or sulfite are increased. Recently, hydrogen sulfide has been recognized as the third gaseous mediator that functions in tissues such as brain and vessel. It is produced from cysteine by cystathione β -synthase (CBS) or cystathionine γ lyase (CSE) in the mammalian body. However, it is difficult to measure the concentration of hydrogen sulfide in blood, because of several interfering substances that impede analysis. In this study, we measured blood concentrations of hydrogen sulfide in hemodialysis patients by Savage's method using high performance liquid chromatography (HPLC). Concentrations of hydrogen sulfide were gradually decreased in water and plasma. Furthermore, there was a tendency for the concentrations of hydrogen sulfide to decrease much faster in blood. In patients treated with hemodialysis, mean plasma hydrogen sulfide was significantly higher than that in healthy controls. Mean plasma hydrogen sulfide in patients with diabetes mellitus was significantly lower than that in patients with glomerulonephritis. Concentrations of hydrogen sulfide were significantly decreased during hemodialysis treatment. Hydrogen sulfide was detected in liquid from the dialyzer at the initial step of each therapy session. Therefore, increase in hydrogen sulfide in blood caused by renal failure is removed by hemodialysis.

三橋 秀基 上毛大橋クリニック 〒371-0046 群馬県前橋市川原町 531-4

Hideki Mitsuhashi Tel : 027-237-2800 Fax : 027-210-3611

〔受付日：2010年9月16日，受理日：2011年1月19日〕

緒 言

原始の地球大気において中心的ガスであった硫化水素は現在も火山口などで高濃度に存在し、青酸ガスと同レベルの有毒ガスとして知られる。多くの生物にとり吸気中高濃度の硫化水素は動物体内に取り込まれたあとミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼを阻害し細胞呼吸を障害して一瞬にして死に到らしめる¹⁾。一方、近年の研究でこの物質は哺乳類体内において産生されることが認識されている。たとえば、口腔内や腸管内では嫌気性細菌により硫化水素は産生され、歯槽膿漏や消化管機能への影響がいられている²⁾。また、体内臓器から生成される硫化水素が一酸化窒素や一酸化炭素に続くガス状メディエーターとして認識されつつあり、神経細胞の機能調節作用や血圧調節作用がいられている³⁾。

以前から硫黄化合物の代謝異常が腎不全患者で起こり、血中の硫黄代謝物が上昇することが知られる⁴⁾。たとえばホモシステインは血液中の濃度が上昇し血栓疾患に関係するといわれ、その臓器障害性作用が問題になっている⁵⁾。また、われわれはガス状の硫黄化合物である亜硫酸が腎不全患者において血中で上昇していることを明らかにした⁶⁾。cystathionine β -synthase (CBS) や cystathionine γ lyase (CSE) により硫化水素に変換されるシステインも血中で透析患者では上昇している⁷⁾。これらのことや硫化水素は硫酸基に変換され尿中に排泄される¹⁾ことから、腎機能が廃絶した腎不全患者において血中硫化水素濃度も異常を示すことが予測される。

現在までのところ硫化水素に関する基礎的研究は進んできているが、臨床的データは少ない。硫化水素濃度は温泉などで測定されるが、そのためには現場で迅速な処理法が必要である⁸⁾。温泉中の硫化水素濃度などは簡便な比色定量法で行われるが、血液中ではさらに低濃度であり感度や特異性の問題があるためこういった方法では臨床的検討は難しい。そのためより感度と特異性の面で有利な高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography : HPLC) を利用した Savage 法^{9,10)}で透析患者の血中濃度につき臨床的検討を行った。

I. 対象と方法

1. 対 象

既往歴がなく内服を行っていない健康成人 (n=12)

の健康診断時採血と当院に通う透析患者 (n=20) の定期採血の一部にて計測した。採血は穿刺直後と回収操作開始直前に行った。血液透析方法は、一回 4~5 時間、週 3 回、血流量は 150~200 mL/min、透析液 (全員無酢酸透析液) 流量 500 mL/min であった。透析患者は採血前 2 週間以内に胸部 X 線写真や HANP 値により適正なドライウェイトにコントロールされていると判断した。また、KT/V は毎月測定され 1.4~1.6 を得られていた。患者は肝炎などの感染症はなく、貧血もエリスロポエチンで治療を受けていた。多くの患者でカルシウムチャンネル阻害剤やアンジオテンシン II 受容体阻害剤などの降圧剤を使用していた。さらに、測定全例で透析中血圧は安定しておりメチル硫酸アメジニウム等は必要としていなかった。そして、糖尿病患者ではインシュリンと食事療法で治療していた。平均年齢は健康成人 48.6 $\pm$ 14.6 歳、透析患者 54.2 $\pm$ 18.2 歳で透析歴は 10.3 $\pm$ 6.3 年である。ヘルシンキ宣言に基づき承諾書を得てから検査を行った。

2. 方 法

島津 HPLC システムを使用した (LC6A, CTO6A, SPD-6AV, C-R6A)。紫外線計測は 670 nm に設定し、1.5 mL/min 等速流量で Hamilton PRP-1 カラム (Reno, NV, USA ; 250 mm $\times$ 4.6 mm, 10 μ m) を使用し測定した。アミン液のストック液は N, N-dimethyl-p-phenylenediamine (Sigma, St. Louis, MO, USA) 12 g を 80 mL の 9.0M 硫酸 (和光) に溶解して作製。アミン液は 9.0M 硫酸に 40 倍でストック液を薄め使用前にその都度作製する。酸化試薬は 50 g の ferric chloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) を 100 mL の MilliQ 水に溶解作製。スタンダードとしての硫化水素液は sodium sulfide (NaHS, 和光) を MilliQ 水に溶解し計測のたびに作製した。液体クロマトグラフィーの移動相は 35% acetonitrile (Sigma, St. Louis, MO, USA)/0.5% 酢酸 (和光)/64.5% Milli-Q 水に p-toluenesulfonic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) を 5 mM で溶解した。

検体処理は 0.4 mL の血漿に 8 μ L の 0.5% 酢酸亜鉛 (和光) を加え、さらに 0.8 mL の MilliQ 水を加えた後に 0.4 mL のアミン液を加える。最後に 16 μ L の酸化試薬を加えて室温に 30 分放置してから、3 分間 4,000 g で遠心する。上澄みを 0.45 μ m のフィルター処理してから分析に使用した。

平均値を記載する際には、平均 $\pm$ 標準偏差で表記した。統計処理は paired および unpaired Student's t test などを用いて p<0.05 で有意差ありとした。また、2 群の相関関係はスピアマンの相関係数を用いた。

図 1 Correlation between H_2S concentrations and UV absorbance

図 2 Plot of disappearance rate of H_2S during incubation ($n=3$)

II. 結 果

1. 測定感度

MilliQ 水に NaHS を溶解しその濃度と吸光度との関係をグラフにした。硫化水素濃度 0.01 mg/L から 10 mg/L までは紫外線吸光度との間に直線関係が得られた (図 1)。正常血漿に 5 mg/L 分の NaHS を加えその回収率につき検討したが、 $96 \pm 1.85\%$ であった。

2. 硫化水素の液中の濃度変化

硫化水素溶液 (MilliQ 水に NaHS を融解し 5 mg/L に調整) を室温 (20 度) 中に放置することにより硫化水素濃度が時間経過で変化するかを調べた。15 分までは大きな変化はなかったが、その後次第に濃度は低下した。同様に正常血漿中と正常血液中および透析患者血漿中に 5 mg/L 分の NaHS を添加し、0 分の時点の測定濃度と比較した。血漿中に加えた場合 1 時間目での低下率は MilliQ 水中よりやや大きい傾向にあった。血液中では 15 分後からすでに低下していき、60 分の段階で血液中の硫化水素は血漿中よりも低下している傾向があった (図 2)。これらのことから血液は迅速に血漿を分離し直ちに酢酸亜鉛を加えその後の処理を行う必要があることがわかった。

3. 検体凍結の影響

上記の NaHS を加えた血漿 (正常人および透析患者) を -70 度にて凍結し翌日室温で融解して濃度を計測した。しかし、硫化水素を検出することはできなかった。したがって、硫化水素測定のため検体を凍結保存することは不可能であることがわかった。

4. 健常人と透析患者での血中濃度の比較

健常人 ($n=12$) の血中濃度は 0.087 ± 0.036 mg/L

図 3 Comparison of H_2S concentrations in plasma of healthy subjects ($n=12$) and HD patients ($n=20$)

であった。透析患者 ($n=20$) の血中濃度は 0.38 ± 0.23 mg/L であり、有意に健常人よりも高い濃度を示した (図 3)。

5. 臨床データと硫化水素濃度との関係

年齢、透析歴や Hb, CRP, BUN, アルブミンなどの基礎データと血漿中硫化水素濃度との相関を検討したが有意な相関関係を示さなかった。性別、透析膜、基礎疾患につき血漿硫化水素の濃度における有意差を計算し表 1 に示した。基礎疾患のみ有意差を示し、糖尿病患者群で腎炎群に比較してかなり低値を示した。この 2 群で濃度が大きく異なることが、透析患者で硫化水素濃度の測定範囲が大きくばらついた理由の一つと考えられる。

6. 透析療法の硫化水素濃度への影響

透析患者 ($n=9$, 糖尿病 3 人, 腎炎 6 人, 最高 0.78

mg/L, 最低 0.089 mg/L) で透析開始時と回収時の硫化水素の血中濃度を比較した (図 4A). 透析開始時の濃度 (0.43 ± 0.24 mg/L) は透析療法により健常人レベルより有意に低いレベル (0.042 ± 0.018 mg/L) まで低下した. 透析液と透析開始直後に得られた透析回路から得た廃液 (n=9) の硫化水素濃度を調べた. 未使用透析液では硫化水素は検出できなかったが, 全例の透析廃液中で硫化水素が検出され平均値は 0.018 ± 0.008 mg/L であった. 透析により血液中より除去されることが透析前後採血での血中硫化水素濃度低下の大きな原因と考えられた. また, 1 週間の間隔をおいて 10 人の透析患者で血漿中硫化水素濃度を比較したが, 高い相関関係が得られた (図 4B). 血中硫化水素は透析によりかなりの割合で除去されるが, 数日の間にほぼ同様のレベルまで上昇することがわかった.

ま と め

硫化水素は液面から蒸発しやすく, 液表層で酸素に

表 1 Correlation between blood H₂S concentrations and other variables

	硫化水素濃度 (mg/L)	P-value
性別		N. S.
男性 (n=12)	0.36 ± 0.25	
女性 (n=8)	0.31 ± 0.19	
透析膜		N. S.
FDX (n=9)	0.33 ± 0.18	
APS (n=11)	0.34 ± 0.18	
原疾患		p<0.05
慢性糸球体腎炎 (n=12)	0.47 ± 0.17	
糖尿病 (n=8)	0.15 ± 0.10	

よる酸化によっても失われるといわれる¹¹⁾. ここで示したように硫化水素は水や血漿に溶解している状態で時間経過とともに比較的急速に濃度が低下していく. さらに, 血液の状態ではより低下速度は速い傾向にあった. これは, 血液細胞が存在することによる代謝除去が急速に起こることが理由として考えられる. 過剰の硫化水素は細胞呼吸を瞬時に破壊するが, ある一定のレベルまでの硫化水素はミトコンドリアにて急速に酸化消去される¹²⁾. ミトコンドリアのない赤血球への硫化水素の作用はよく知られていない. しかし, 硫化水素は細胞膜透過性が高いうえにヘモグロビン蛋白に結合しやすいといわれ, 赤血球細胞に吸収された可能性もある^{12,13)}. 温泉などの硫化水素を測る際に採取場で液中の硫化水素をその場で迅速に固定する⁸⁾. 今回の実験から血液において正確に安定に硫化水素濃度を測るため迅速な血漿分離後の酢酸亜鉛固定が重要であると考えられた. したがって, われわれは一人ずつ計測を行った. 一度に複数人を採血し計測する場合には先に採血を行われた人が実際よりも濃度が低値を示してしまう可能性があり注意が必要である.

近年, Perna らも透析患者にて硫化水素濃度を測定している. 彼らの研究では透析患者においてその血中濃度は健常人に比較してわずかに低値を示していて, われわれの研究と異なる結果となっている. その理由は二つ考えることができる. 一つは人種差や環境の影響が考えられる. 表現している単位がこの二つの研究で異なるが, 透析患者での濃度は両研究で近いレベルにある. 以前, 同様なガス状物質である亜硫酸濃度を正常人血液中で測定した. 日本人では欧州人の 3 分の 1 程度の亜硫酸濃度であり, 食文化や環境の違いによ

図 4 (A) Changes in H₂S concentrations after HD treatment in 9 patients receiving maintenance HD. (B) Correlation of blood hydrogen sulfide concentrations in same HD patients at different treatment days (n=10).

ると考えられた⁶⁾。にんにくなどに硫化水素生成の成分が含まれるが、食事内容が硫化水素産生に影響を与える可能性がある。イタリア人は野菜や果物を日本人の三倍も食することが知られる¹⁴⁾。つまり、イタリアの正常人において食習慣の違いから日本人より硫化水素が血中で高値となったが、腎不全患者で透析食となることで日本人と同様の血中濃度になる可能性である。もう一つはこの二つの研究の測定方法の違いに由来する可能性である。温泉などと異なり生体試料を簡便な色素法で測る場合には測定に誤差が出る可能性があるため、Savageが複雑だが正確な HPLC を使用した方法を発表している⁹⁾。つまり、色素法では正常人で硫化水素濃度が高くなるが、腎不全物質が反応を阻害して逆に透析患者では硫化水素濃度が低く出てしまった可能性である。臨床的な硫化水素研究を広げるために、この二つの測定法の比較検討が今後必要である。

CBS や CSE などの硫化水素産生酵素は神経組織や血管など体内に広く同定されていて³⁾、これらが血液中の硫化水素の大きな産生源と考えられる。すでに知られるように透析患者では硫黄関連代謝が障害されシステイン、ホモシステインや亜硫酸などが血中に高値を示す^{4,5)}。今回得られた透析患者での血中濃度の上昇は硫化水素産生の原料となる物質の上昇に伴い産生が亢進した可能性が考えられる。また、透析患者は便秘などの消化器異常を伴いやすく、腸管内発生硫化水素の消化管からの吸収経路も否定できない。一方で腎不全での硫化水素消去能の変化も推測できる。硫化水素はその毒性から正常では狭い範囲の濃度に厳密にコントロールされていて消去メカニズムも存在する。たとえば、吸入された硫化水素は体内に入り速やかにミトコンドリアのチトクロームオキシダーゼにより酸化され硫酸基に変化し尿路系から排泄される¹⁾。しかし、透析患者においてミトコンドリアの機能異常が存在していることが知られており¹⁵⁾、ミトコンドリアによる消去能低下や腎不全による尿中排泄低下がおこり硫化水素が蓄積される可能性も考えられる。

血漿中硫化水素濃度は糖尿病群で慢性糸球体腎炎群より有意に低値を示した。その原因を今回の研究から明らかにすることはできないが、いくつかその理由を過去の知見から推察できる。まず、硫化水素生成の原料となるシステインの血中濃度の違いによるものである。非糖尿病腎不全患者で血中に増加しているシステインが糖尿病腎不全患者では低下していることが報告されている^{5,16)}。そのために糖尿病腎不全患者では血管からの硫化水素産生が減少する可能性である。次

に、糖尿病による腎不全患者で起こる重度の血管障害によるものである。石灰化に至っているような状態では血管からの硫化水素産生が減少するが¹⁷⁾、糖尿病腎不全患者においては石灰化などの血管障害が非糖尿病腎不全患者より重度であることが報告されている^{18,19)}。つまり、糖尿病腎不全患者で血管における生物学的利用能低下が起きているためである。これらのことを明らかにするために、糖尿病腎不全患者での血中含硫アミノ酸濃度と硫化水素濃度の相関などの臨床的検討や糖尿病のモデル動物における血管臓器などでの硫化水素産生能の検討が有用と思われる。

硫化水素は吸入された場合極めて有毒な物質であるため、環境の点からその空気中濃度と人体に与える濃度についてはすでによく研究されている¹⁾。しかし、一般に研究されている硫化水素の役割はワンショットでの検討が多く、恒常的な硫化水素の体内での上昇がいかなる働きをするかわかっていない。今のところ、NaHS を単発投与した研究が主であるが、硫化水素の哺乳類への有用な役割としては血管弛緩による血圧低下作用が考えられている^{20,21)}。また、硫化水素は homocysteine による血管障害作用を抑制することも示されている²²⁾が、今回の研究での腎炎患者において血中の硫化水素濃度はそれらの濃度に近いレベルであった。しかし、糖尿病群では腎炎群より大きく低下しており、糖尿病患者では硫化水素による血管保護作用能力が低下している可能性があると考えられる。さらに、透析により血中硫化水素濃度が正常レベル以下まで低下することがわかった。血中硫化水素が透析中に低下することは透析患者が透析前の水分容量増加による血圧上昇を緩和するためや透析後体液減少による血圧低下を防ぐ可能性があり人体に望ましい現象と思われる。しかし、今回の実験で透析開始時の血中硫化水素濃度にかかなり個人差があるにもかかわらず全例で透析中血圧は落ち着いていた。実際に透析による硫化水素の除去が透析の血圧低下防御にどれだけ寄与するか決定するには、透析除水速度、除水量、降圧薬の種類や透析中の細かな血圧変動などや硫化水素の濃度とその変化などのさらに他因子を含めたより大規模な解析で検討する必要がある。また、中枢神経系への硫化水素の作用も知られるが血圧に影響を与える自律神経系への作用はまだ不明であり、その検討も今後必要である。

硫化水素のようなガス状物質としてすでに一酸化窒素が知られている¹⁹⁾。作用点は異なるが一酸化窒素も血管拡張に働き、透析患者において一酸化窒素の働きは血行動態的に重要であることがすでに知られる²³⁾。

また、一酸化窒素は CBS に働き硫化水素産生を高めるといわれるが、この二つの物質は蛋白の SH 基への結合においては互いに拮抗することが知られている²⁴⁾。一方で、硫化水素は哺乳類の細胞の増殖に影響を与えることが知られる。同じく火山ガス成分でありながら人体内で産生される亜硫酸は、酵母などの細胞では硫化水素と相反して細胞機能を調節することが知られている²⁵⁾。以前のわれわれの研究で炎症条件下硫化水素が亜硫酸に酸化代謝される可能性¹⁰⁾と、腎不全患者での亜硫酸血中濃度上昇を示した⁶⁾。亜硫酸は硫化水素と逆に平滑筋収縮に働き血圧上昇作用の可能性がいわれている²⁶⁾。これらのことから腎不全での体内での硫化水素の作用は一酸化窒素や亜硫酸など他のガス状の物質との複雑な相互関係の上に成り立つことが予測される。

文献

- 1) Milby TH, Baselt RC : Hydrogen sulfide poisoning : clarification of some controversial issues. *Am J Ind Med* 35 : 192-195, 1993
- 2) Florucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace J : The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterol* 131 : 259-271, 2006
- 3) Abe K, Kimura H : The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neuroscience* 16 : 1066-1071, 1996
- 4) Kirschbaum B : Effect of hemodialysis on the hyper-sulfatemia of chronic renal failure. *ASAIO J* 44 : 314-318, 1998
- 5) Perna AF, Ingrosso D, Satto E, Romano M, Cimmno A, Galletti P, Zappia U, De Santo NG : Metabolic consequences of hyperhomocysteinemia in uremia. *Am J Kidney Dis* 38 : s85-s90, 2001
- 6) Kajiyama H, Nojima Y, Mitsunashi H, Ueki K, Tamura S, Sekihara T, Wakamatsu R, Yano S, Naruse T : Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 11 : 923-927, 2000 Channel opener
- 7) Reis PF, daSilva CD, Brunini TM, Moss MB, Siqueira MA, Santos SF, Roberts NB, Ellory JC, Mann GE, Mendes-Ribeiro AC : Plasma amino acid profile and L-arginine in red blood cells from malnourished uremic patients. *J Ren Nutr* 16 : 325-331, 2006
- 8) 深沢嘉延 : 光線分析法指針と温泉分析. *温泉化学* 49 : 65-75, 1998
- 9) Savage JC, Gould DH : Determination of sulphide in brain tissue and rumen fluid by ion interaction, high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 526 : 530-545, 1990
- 10) Mitsunashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y : Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* 24 : 529-534, 2006
- 11) Pace NR : A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276 : 734-740, 1997
- 12) Moore PK, Bhatia M, Mochhala S : Hydrogen Sulfide : from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24 : 609-611, 2003
- 13) Searcy DG, Lee SH : Sulfur reduction by human erythrocytes. *J Exp Zool* 282 : 310-322, 1998
- 14) Nutrition and obesity. *World health data book 2007/2008*, p323-324, Euromonitor Intl. London, 2009
- 15) Granata S, Zaza G, Simone S, Villani G, Latorre D, Pontrelli P, Carella M, Paolo F, Grandaliano G, Schena FP : Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *BMC genomics* 10 : 388, 2009
- 16) Wollensen F, Bratstrom L, Refsum H, Ueland PM, Berglund L, Berns C : Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus. *Kidney Int* 55 : 1028-1035, 1999
- 17) Lowicka E, Beltowski J : Hydrogen sulfide-the third gas of interest for pharmacologist. *Pharmacological Reports* 59 : 4-24, 2007
- 18) Taniwaki H, Ishimura E, Tabata T, Tsujimoto Y, Shioi A, Shoji T, Inaba M, Inoue T, Nishizawa Y : Aortic calcification in haemodialysis patients with diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 20 : 2472-2478, 2005
- 19) Ishimura E, Okuno S, Taniwaki H, Kizu A, Tsuchida T, Shioi A, Shoji T, Tanata T, Inaba M, Nishizawa Y : Different risk factors for vascular calcification in end-stage renal disease between diabetics and nondiabetics : the respective importance of glycemic and phosphate control. *Kidney Blood Press Res* 31 : 10-15, 2008
- 20) Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA : A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 13 : 25-97, 1984
- 21) Zhao W, Zang J, Lu Y, Wang R : The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} Channel opener. *EMBO J* 20 : 6008-6016, 2001
- 22) Wang R : Is H₂S a stinky remedy for atherosclerosis? *Atheroscler Thromb Biol* 29 : 156-160, 2009
- 23) Pryor WA, Houk KN, Foote CS, Fukuto JM, Ignarro LJ, Squadrito GL, Davies KJ : Free radical biology and medicine. It's a gas, Man. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291 : R491-511, 2006
- 24) Thuraishingham RC, Yaqoob MM : Oxidative consumption of nitric oxide : a potent mediator of uremic vascular disease. *Kidney Int* 84 (Suppl) : S29-32, 2003
- 25) Kruszyna H, Kruszyna R, Smith RP : Cyanide and

- sulfide interact with nitrogenous compounds to influence the relaxation of various smooth muscles. Proc Soc Exp Biol Med 179 : 44-49, 1985
- 26) Sohn H, Kuriyama H : The role of amino acids in the regulation of hydrogen sulfide production during ultradian respiratory oscillation of *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 176 : 69-78, 2001
- 27) Yu MF, Gorenne I, Su X, Moreland RS, Kotlikoff MI : Sodium hydrosulfite contraction of smooth muscle are calcium and myosin phosphorylation independent. Am J Physiol 275 : L976-982, 1998