

原

著

アルギニンバゾプレッシンによる血管平滑筋
細胞内カルシウムイオン濃度の分布に
及ぼすハロセンの影響

新潟大学医学部麻酔学教室（主任：下地恒毅教授）

富士原 秀 善

Effects of Halothane on the Arginine-vasopressin-
induced Spatial and Temporal Dynamics
of Intracellular Ca^{2+} Concentration in
Single Cultured Smooth Muscle Cells
of the Rat Aorta

Hideyoshi FUJIHARA

*Department of Anesthesiology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Koki SHIMOJI)*

The effects of halothane on the spatial and temporal dynamics of intracellular Ca^{2+} concentration in single cultured smooth muscle cells of the rat aorta were studied by digital imaging microscopy using Ca^{2+} indicator fura-2. Changes in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ were expressed as the ratios of fluorescence intensity at 500 nm excited by 340 nm and 380 nm. Halothane (0.5, 1.0, 2.0 vol. %) itself had no detectable basal $[\text{Ca}^{2+}]$ changes in these cells. Arginine-vasopressin (AVP; 10^{-7} M), one of vasoconstrictor agonists which mobilize intracellular Ca^{2+} by inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release mechanism, increased the nuclear $[\text{Ca}^{2+}]$ more than the cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$. The increases in the nuclear $[\text{Ca}^{2+}]$ induced by AVP were greatly reduced by pretreatment with caffeine and ryanodine which deplete the caffeine-ryanodine sensitive intracellular Ca^{2+} storage. Halothane (0.5, 1.0, 2.0 %) greatly attenuated the increase in $[\text{Ca}^{2+}]$ in both the nuclear and cytosolic regions. Halothane (1.0, 2.0 %) abolished the differential rise in $[\text{Ca}^{2+}]$ in both regions

Reprint requests to: Hideyoshi FUJIHARA,
Department of Anesthesiology, Niigata
University School of Medicine,
Asahimachi-dori 1, Niigata City,
951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部麻酔学教室 富士原秀善

in response to AVP. The times to the peak responses of $[Ca^{2+}]_i$ were significantly prolonged by halothane. The results suggest that nucleus and/or perinuclear region are important Ca^{2+} store sites in response to AVP, and also that the caffeine and ryanodine sensitive Ca^{2+} storage sites exist in the perinuclear region. The results further suggest that halothane affects arginine-vasopressin-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase by an inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate production and/or by an inhibition of inositol 1, 4, 5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} storage sites.

Key words: halothane, arginine-vasopressin, intracellular Ca^{2+} concentration, fura-2, digital imaging microscopy, nucleus, cytosol, inositol 1, 4, 5-trisphosphate
ハロセン, アルギニンバゾプレッシン, 細胞内カルシウム濃度, fura-2, 顕微鏡画像解析, 核, 細胞質, イノシトール 1, 4, 5-三リン酸

I. 緒 言

血管収縮薬は、一般に血管平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させ、血管収縮をきたすと考えられている¹⁾²⁾。細胞内 Ca^{2+} は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルあるいは受容体作動性 Ca^{2+} チャンネルを介する細胞外からの流入、及びイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) を介する細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によって供給される³⁾。従来、光電子倍増管を利用したシステムによって細胞あるいは組織全体としての $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を観察したという報告がなされてきた⁴⁾⁵⁾。しかし、この方法では、個々の細胞内で Ca^{2+} 濃度がどのように分布しあるいはそれがどのような経時的変化を示すのかを明らかにすることはできなかった。近年蛍光 Ca^{2+} 指示薬 fura-2 を用いた顕微鏡画像解析により、種々の血管収縮薬に対する血管平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 分布を明らかにする試みがなされている^{6)~9)}。アルギニンバゾプレッシン (AVP) は、 IP_3 を介して細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出をきたす血管収縮薬の一つである^{4)10)~12)}。 IP_3 がラット肝細胞の核分画から Ca^{2+} を放出させ、その結果、一過性に核の $[Ca^{2+}]_i$ を減少させるという報告がある¹³⁾。またラット小脳皮質のブルキンエ細胞において IP_3 の受容体が核膜にも存在するという報告がある¹⁴⁾。しかし、血管平滑筋における核の Ca^{2+} の生理学的な役割については知られていない。

従来、全身麻酔薬の作用機序について多くの報告がなされてきている^{15)~19)}。これらの報告のなかでも、全身麻酔薬のひとつであるハロセンは骨格筋および心筋の筋小胞体から Ca^{2+} を放出させ、貯蔵 Ca^{2+} を枯渇させることにより筋収縮を抑制するとされている^{20)~25)}。ま

たハロセンは、血管平滑筋に直接作用し血管拡張をきたすとされている^{26)~29)}。しかし血管平滑筋細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対するハロセンの影響は明らかではない。

そこで本研究では蛍光カルシウム指示薬 fura-2 を用いた顕微鏡画像解析により、1) AVP による血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対する影響、2) ハロセン単独の血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対する影響、3) AVP による血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に及ぼすハロセンの影響を核と細胞質にわけて検索したので報告する。

II. 方 法

1) 細胞培養

Wistar 系ラット (6~8週令, 体重 200~250 g) の胸部大動脈をエーテル麻酔下に摘出後、ダルベコ変法イーグル培地内で脂肪組織、外膜、内皮を除去した後、厚さ 1~2 mm の輪状標本を作成し、培養皿内のカバースリップ上に置き、炭酸ガス培養器内で培養した。培養後 3~4 日頃から輪状標本の内側および外側に平滑筋細胞が遊走、増殖した。培養細胞が形態学的に血管平滑筋細胞であるかをミオシン重鎖に対する蛍光抗体を用いて蛍光顕微鏡によりその存在を確認した。

2) 測定方法

培養後 4~7 日目にカバースリップ上の血管平滑筋細胞を蛍光カルシウム指示薬 fura-2 のアセトキシメチルエステル体である fura-2/AM (Dojin) 20 μ M および非イオン性界面活性物質 Pluronic® F-127 (Calbiochem) 0.02% を含む溶液 (組成: (mM): 140 NaCl, 5.9 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 1.4 $MgCl_2$, 5N-2 hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES), 11.5 glucose, and 1.8 $CaCl_2$; pH 7.4) 中で 120 分間室温で染色した。染色後、上記溶液中に 30 分間静置した後、倒立型顕微鏡

(Diaphot, Nikon) 上の測定用チャンパー (容量 1.0 ml) 内に固定し, 95% O₂-5% CO₂ で十分に通気したクレブス液 (組成: (mM):118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 27.4 NaHCO₃, 11 glucose, 2.5 CaCl₂; pH 7.4, 37°C) で灌流した. Ca²⁺ 除去クレブス液は, CaCl₂ を加えずに調製したクレブス液に 2 mM の ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) を添加して作成した. ハロセン溶液 (0.5%, 1.0%, 2.0%) は, 1 気圧下で, クレブス液 (37°C, pH 7.4) と 1% ハロセンガスが平衡にあるとき, クレブス液中のハロセン濃度が 300 μ M に相当することに基いて調整し³⁰⁾, ガスクロマトグラフィー (島津, GC-6AM) により溶液中のハロセン濃度を確認した. 観察は, 対物 100 倍レンズ (Nikon, Fluor 100, oil) を用いて行った. 励起用光源 (日本分光, CAM-500) から 340 nm, 380 nm の励起光を交互に照射し, 500 nm

における 340 nm 励起蛍光および 380 nm 励起蛍光を SIT カメラ (浜松ホトニクス, C-2400-08) により取得し, 画像処理装置 (浜松ホトニクス, ARGUS-200) により 500 nm における 340 nm 及び 380 nm の 2 つの励起波長に対する蛍光強度比 (R 340/380) を計算し, 蛍光強度比画像を作成した. 蛍光強度比画像上で核および細胞質に各々 7 個の大きさ 1 μ m² のウィンドウを設定して, 各ウィンドウの蛍光強度比の平均値をもって核および細胞質の蛍光強度比とした. [Ca²⁺]_i の絶対値を求める上で理論的な問題点があることが指摘されており³¹⁾, また蛍光強度比は [Ca²⁺]_i と相関する⁷⁾³²⁾ ので, [Ca²⁺]_i の絶対値を求めることは行わず, 蛍光強度比 (R 340/380) をもって [Ca²⁺]_i の指標とした.

3) 実験プロトコール

- a) AVP による血管平滑筋の [Ca²⁺]_i 分布に対する影響

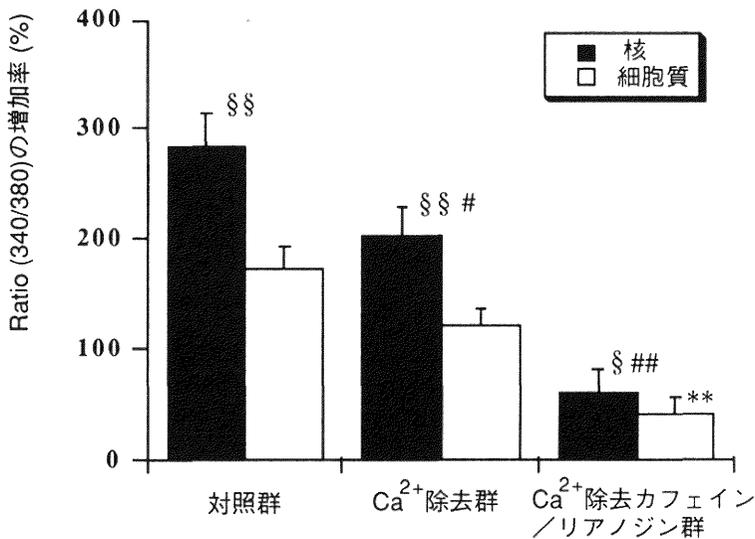


図 1 アルギニンバゾプレッシンによる血管平滑筋の [Ca²⁺]_i 分布に対する影響

対照群, Ca²⁺ 除去群, Ca²⁺ 除去カフェイン/リアノジン群における核および細胞質の [Ca²⁺]_i 増加率 (R 340/380) を示す (平均値±標準誤差, 対照群 n=15, Ca²⁺ 除去群 n=18, Ca²⁺ 除去カフェイン/リアノジン群 n=17).

Ca²⁺ 除去群, Ca²⁺ 除去カフェイン/リアノジン群のいずれの群においても核の [Ca²⁺]_i 増加率の方が細胞質の [Ca²⁺]_i 増加率よりも高かった (§; p<0.05, §§; p<0.01 対 細胞質の [Ca²⁺]_i 増加率). Ca²⁺ 除去群の核の [Ca²⁺]_i 増加率, Ca²⁺ 除去カフェイン/リアノジン群の核および細胞質の [Ca²⁺]_i 増加率は, 対照群に比べ, 有意に低かった (#; p<0.05, ##; p<0.01 対 対照群の核の [Ca²⁺]_i 増加率, **; p<0.01 対 対照群の細胞質の [Ca²⁺]_i 増加率).

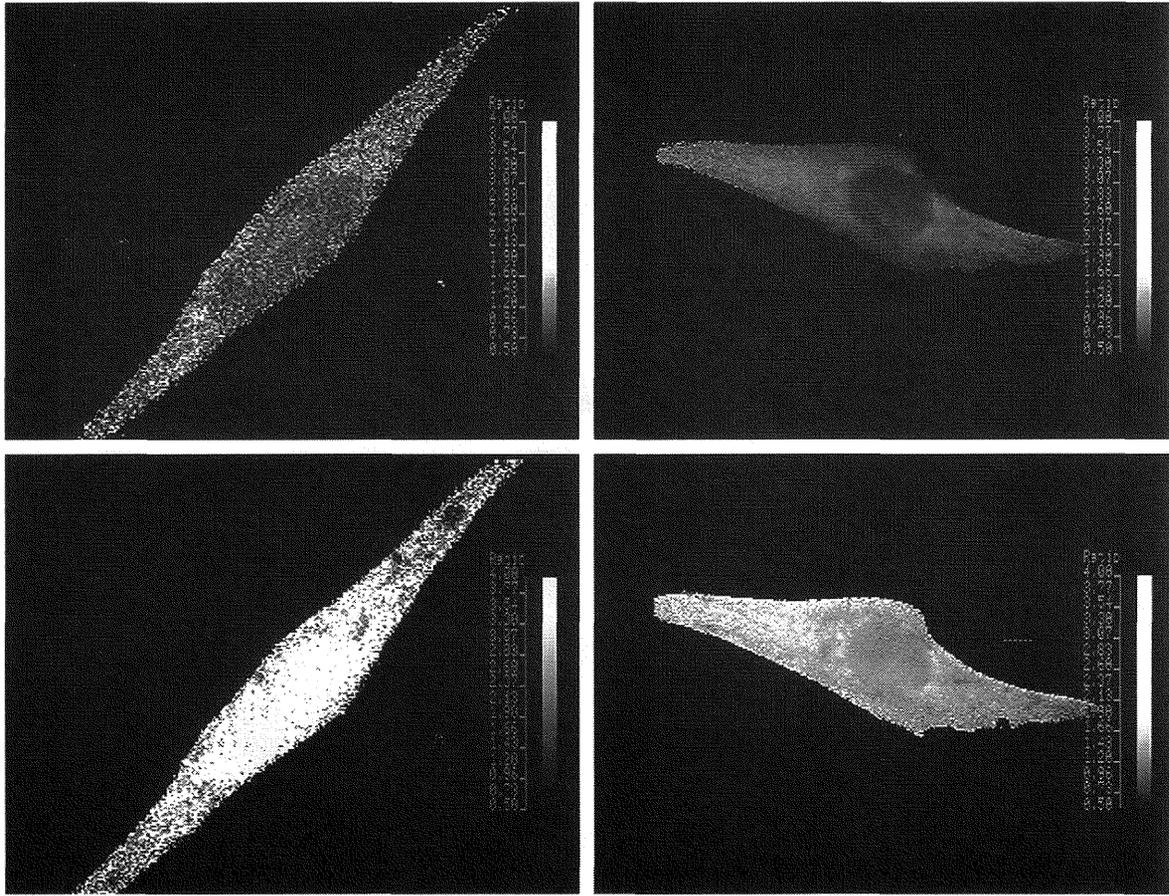


図 2 アルギニンバゾプレッシンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の蛍光比画像の例

各画像の右のカラムに蛍光比 (R 340/380) 0.5 から 4.0 をグレイスケールで対応させてある。

図の左側に対照群, 右側に Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群の蛍光比画像の例を示す. 左上図はアルギニンバゾプレッシン (AVP) $10^{-7} M$ 投与直前, 左下図は投与後 8 秒 (最大反応時) のものである. 右上図は AVP $10^{-7} M$ 投与直前, 右下図は投与後 30 秒 (最大反応時) のものである. 対照群の最大反応時 (左下図) においては核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ が著明に上昇したが, Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群では, AVP による最大反応時 (右下図) においても, 核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が特に抑制され, 蛍光比画像上, 核および核周囲領域をその周囲の細胞質と容易に区別することができた。

AVP 10^{-7} M 投与を細胞外液 Ca^{2+} 濃度 2.5 mM (対照群), 細胞外液 Ca^{2+} 濃度 0 mM (Ca^{2+} 除去群), カフェイン 20 mM およびリアノジン 20 μM 3分間前処置下細胞外液 Ca^{2+} 濃度 0 mM (Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群) の3群に対して行い, 核と細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) の増加率を比較した。

b) ハロセン単独の血管平滑筋の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布に対する影響。

ハロセン3分間処置をその投与濃度によりハロセン0.5%群 (0.5%群), ハロセン1.0%群 (1.0%群), ハロセン2.0%群 (2.0%群) に分けて行い, 核と細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) のハロセン処置前値と処置後最大値を比較した。

c) AVP による血管平滑筋の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布に対するハロセンの影響。

AVP 10^{-7} M 単独投与群 (対照群) およびハロセン3分間前処置下に AVP 10^{-7} M を投与したハロセン0.5%+AVP 10^{-7} M 群 (0.5%群), ハロセン1.0%+AVP 10^{-7} M 群 (1.0%群), ハロセン2.0%+AVP 10^{-7} M 群 (2.0%群), に対し, 核および細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) の増加率を比較した。また, 各群での最大反応までの時間を求め比較した。

データはすべて平均±標準誤差で示し, 同一群内の比較は Wilcoxon 検定により, 群間の比較は Mann-Whitney 検定によって有意差検定を行い, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

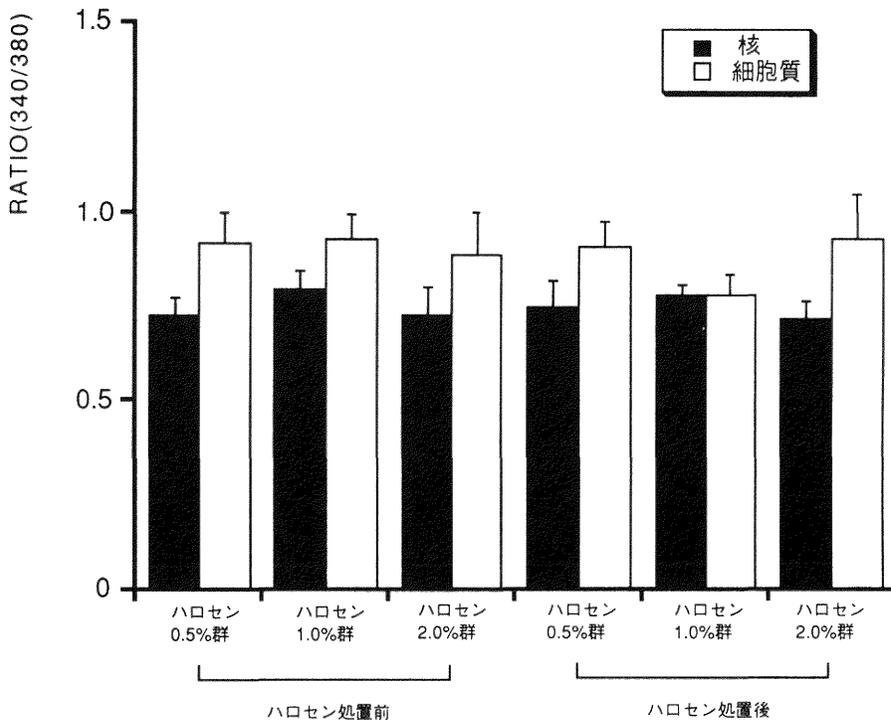


図3 ハロセン単独の血管平滑筋の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 分布に対する影響

ハロセン0.5%群, 1.0%群, 2.0%群のハロセン3分間処置前後の核, 細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) を示す (平均値±標準誤差, ハロセン0.5%群 $n=6$, ハロセン1.0%群 $n=11$, ハロセン2.0%群 $n=5$)。

ハロセン0.5%群, 1.0%群, 2.0%群のハロセン3分間処置前の核, 細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) には差はなかった。

ハロセン0.5%群, 1.0%群, 2.0%群のハロセン3分間処置前と処置後の核, 細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) には差はなかった。

ハロセン0.5%群, 1.0%群, 2.0%群のハロセン3分間処置後の核, 細胞質の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (R 340/380) には差はなかった。

Ⅲ. 結 果

a) AVP による血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対する影響

対照群, Ca^{2+} 除去群, Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群のいずれの群においても核の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率の方が細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率よりも高かった (図 1).

Ca^{2+} 除去群の核の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率, Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群の核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率は, 対照群に比べ, 有意に低かった (図 1).

図 2 に対照群および Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群の蛍光比画像の例を示した. 図 2 に示すように, 対照群では核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ が著明に上昇したが, Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群では, 核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が抑制され, AVP

による最大反応時でも蛍光比画像上, 核および核周囲領域をその周囲の細胞質と容易に区別することができた.

b) ハロセン単独の血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対する影響

ハロセン 0.5%群, 1.0%群, 2.0%群で, ハロセン処置前の核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ は群間で差はなかった (図 3).

0.5%群, 1.0%群, 2.0%群でハロセン処置前とハロセン 3 分間処置後の $[Ca^{2+}]_i$ には差はなかった (図 3).

ハロセン 3 分間処置後の核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ は群間で差はなかった (図 3).

c) AVP による血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対するハロセンの影響

ハロセン (0.5%, 1.0%, 2.0%) により核および細胞質の AVP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制した (図 4).

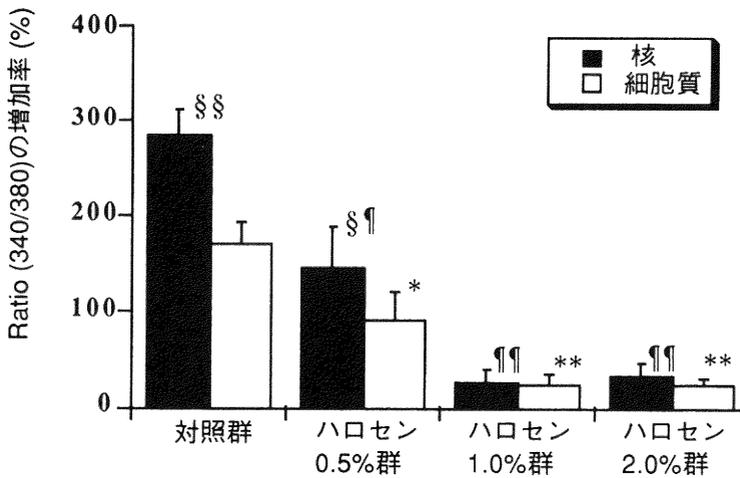


図 4 アルギニンバゾプレッシンによる血管平滑筋の $[Ca^{2+}]_i$ 分布に対するハロセンの影響

対照群およびハロセン 0.5%群, 1.0%群, 2.0%群におけるアルギニンバゾプレッシン (AVP) 10^{-7} M 投与による $[Ca^{2+}]_i$ の増加率を示す (平均値±標準誤差, 対照群 n=15, ハロセン 0.5%群 n=6, ハロセン 1.0%群 n=11, ハロセン 2.0%群 n=5).

対照群では, AVP 投与により核の $[Ca^{2+}]_i$ は細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ よりも高くなった (§ §; $p < 0.01$ 対 細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率).

ハロセンにより核および細胞質の AVP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制された (¶; $p < 0.05$, ¶¶; $p < 0.01$ 対 対照群の核の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率, *; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ 対 対照群の細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率).

ハロセン 0.5%群では AVP 投与により核の $[Ca^{2+}]_i$ は細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ よりも高くなったが (§; $p < 0.05$ 対 細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 増加率), ハロセン 1.0%群, 2.0%群では, 対照群で観察された核と細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇程度の相違は消失した.

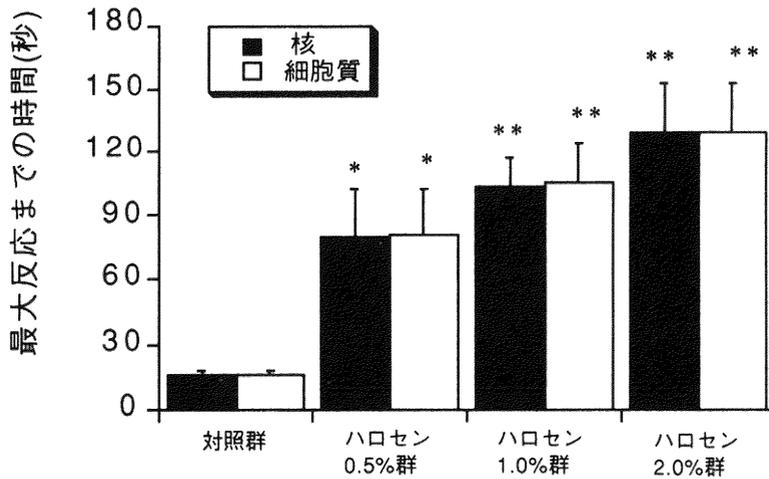


図5 アルギニンバゾプレッシンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大反応までの時間

対照群およびハロセン 0.5%群, 1.0%群, 2.0%群におけるアルギニンバゾプレッシン 10^{-7} M 投与による $[Ca^{2+}]_i$ (R 340/380) 上昇の最大反応までの時間を示す (平均値±標準誤差, 対照群 n=15, ハロセン 0.5%群 n=6, ハロセン 1.0%群 n=11, ハロセン 2.0%群 n=5).

ハロセン 0.5%群, 1.0%群, 2.0%群では, 核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ (R 340/380) 上昇の最大反応までの時間が有意に延長した (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 対 対照群).

ハロセン (1.0%, 2.0%) により対照群で観察された核と細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇程度の相違は消失した (図 4). またハロセンは, AVP による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇において, 最大反応までの時間を有意に延長した (図 5).

IV. 考 察

実験結果から, AVP が核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させることがわかった. このことは, 核あるいは核周囲領域の Ca^{2+} が, AVP に反応することを示唆している. 蛍光比画像上, 対照群の AVP による最大反応においては, 核および核周囲領域の蛍光比のびまん性の上昇が観察された. 一方, Ca^{2+} 除去カフェイン/リアノジン群では, 核および核周囲領域の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が抑制され, AVP による最大反応時でも蛍光比画像上, 核および核周囲領域をその周囲の細胞質と容易に区別することができた. 平滑筋細胞において核周囲領域は, 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位 (筋小胞体) と連絡をもつとされている³³⁾. したがって, カフェイン/リアノジン感受性の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位が, 核または核周囲領域に存在することが示唆された.

Iino らによれば, 平滑筋細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位は, 機能的にカフェインあるいは IP_3 に感受性をもつもの (S_α) と, IP_3 のみに感受性をもつもの (S_β) とに分類されている³⁴⁾. S_α と S_β の割合は平滑筋の種類によって異なるとされている³⁴⁾, ラットの大動脈の平滑筋細胞における S_α と S_β の割合に関する報告はない. リアノジン処置により, カフェインあるいは IP_3 に感受性をもつ Ca^{2+} 貯蔵部位の Ca^{2+} チャンネルは開口固定され, Ca^{2+} 貯蔵部位の Ca^{2+} は枯渇するとされている³⁴⁾. 今回の実験結果において, カフェイン/リアノジン処置により AVP による $[Ca^{2+}]_i$ の増加率は, 対照群に比べ約70%減少した. このことは, 核の $[Ca^{2+}]_i$ の増加は, 大部分がカフェインおよび IP_3 に感受性をもつ Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によるものであることを示している. さらに, カフェイン/リアノジン前処置後も核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された. この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は IP_3 のみに感受性をもつ細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位 (S_β) からの Ca^{2+} 放出によるものである可能性も否定できない.

AVP は, 核の $[Ca^{2+}]_i$ を細胞外液の Ca^{2+} を除去

した場合においても上昇させた。このことから、AVPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞外液の Ca^{2+} に依存しないことがわかった。多くのホルモンや血管作動性ペプチドが、 IP_3 受容体を介した反応により IP_3 感受性細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} を放出させることが知られている³⁾³⁵⁾。しかし、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位に関して、その解剖学的、空間的な部位の同定がなされるには至っていない³⁾。ラット小脳のプルキンエ細胞において IP_3 受容体の分布を調べた報告によれば、その多くは滑面小胞体上に分布しているが、一部核膜上にも存在する¹⁴⁾。またラット肝細胞の核分画に IP_3 を直接投与すると、核からの Ca^{2+} 放出が生じ、一過性に核の Ca^{2+} 濃度が減少するという報告もある¹³⁾。本研究の実験結果から、 IP_3 を介する細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出をきたすとされている血管収縮薬の一つであるAVP⁴⁾¹⁰⁾–¹²⁾により、核の Ca^{2+} 濃度が上昇することがわかった。現在のところ、ラット大動脈平滑筋細胞の核膜上における IP_3 受容体の存在は未だ報告されていないが、核も細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の一つである可能性を完全に否定することはできないと考えられる。

ハロセン単独処置によっては核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ の有意な変化はおこらなかった。発光蛋白 aquorin を用いた最近の報告³⁶⁾では、A10細胞、BC₃H1細胞においてハロセンは細胞外液 Ca^{2+} 除去溶液中においても一過性の Ca^{2+} 上昇をきたし、Indo-1を用いたSillら³⁷⁾の報告によると、A7r5細胞においてハロセン単独では $[Ca^{2+}]_i$ の動態に変化はなかった。ハロセン単独の血管平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に対する影響については、平滑筋細胞種、 $[Ca^{2+}]_i$ の測定方法の違いも考慮する必要があると考えられる。

今回の実験でハロセン(0.5%)はAVPによる核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を同程度(50%)に抑制した。Sillら³⁷⁾は、ハロセンはAVPによる IP_3 産生を抑制したと報告している。心筋筋細胞内ハロセン分布に関する報告³⁸⁾では、ハロセンはミトコンドリアに最も高濃度に集積し、核、核周囲、筋鞘、筋形質膜、細胞質においては同程度の集積がみられたとしている。したがって、ハロセンの作用機序の一つとして、細胞膜における抑制作用が考えられる。

ハロセンは細胞膜の脂質あるいは膜蛋白に作用し膜の性質を変えることによって非特異的な作用を及ぼすとする報告もある¹⁸⁾。もしハロセンの作用がAVP受容体に対し特異的ならば、AVPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大反応時間は、最大反応の大きさが抑制されるとしても、

対照群と同等になると考えられる。しかし、今回の実験でハロセンは、AVPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最大反応を抑制するとともに最大反応までの時間を遅らせた。したがって、ハロセンの細胞膜に対する作用は、細胞膜そのものに対する非特異的な影響も十分考えられる。しかし、ハロセンが核および核周囲の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出機構を抑制する可能性も否定できない。

V. ま と め

アルギニンバゾプレシリン(AVP 10^{-7} M)による $[Ca^{2+}]_i$ の分布とそれに及ぼすハロセン(0.5%, 1.0%, 2.0%)の影響を、ラット大動脈血管平滑筋培養細胞を用いた顕微鏡画像解析により検索した。AVPにより細胞質だけでなく核の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された。AVPによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、核の方が細胞質よりも高く、機序は不明であるが、核も重要な細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位であることが示唆された。ハロセンは、AVPによる核および細胞質の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をともに抑制した。AVPは主としてイノシトール1, 4, 5-三リン酸(IP_3)を介する細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出をきたすと考えられている。ハロセン単独では骨格筋、心筋と異なり、血管平滑筋 $[Ca^{2+}]_i$ に対する直接作用はないと考えられた。今回の結果から血管平滑筋におけるハロセンの作用機序の一つとして細胞膜における抑制作用が考えられた。しかし、核および核周囲領域の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出機構を抑制する可能性も否定できない。核および核周囲領域の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出機構は、AVPレセプター、 IP_3 の産生過程あるいは IP_3 の作用部位(筋小胞体)と密接な関連があり、今後さらに検索をすすめる必要があると考える。

VI. 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部麻酔学教室下地恒毅教授に深甚なる謝意を表すと同時に御指導を賜りました新潟大学医学部麻酔学教室福田悟助教授、藤原直土講師、佐藤由紀夫技官に深謝申し上げます。また、血管平滑筋細胞培養において適切な御助言を頂きました新潟大学医学部ウイルス学教室浜田忠弥教授、新潟大学医学部第二内科学教室佐伯敬子先生、新潟大学医学部腎研究免疫学部門森岡哲夫先生に深謝致します。さらに本研究を進めるにあたり絶えず協力して

頂きました新潟大学医学部解剖学教室金沢寛明先生に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) **Abdel-Latif, A.A.**: Calcium-mobilizing receptors, polyphospho-inositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.*, **38**: 227~272, 1986.
- 2) **Minneman, K.P.**: α 1-Adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca^{2+} . *Pharmacol. Rev.*, **40**: 87~119, 1988.
- 3) **Berridge, M.J. and Irvine, R.F.**: Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*, **341**: 197~205, 1989.
- 4) **Capponi, A.M., Lew, P.D. and Vallotton, M.B.**: Cytosolic free calcium levels in monolayers of cultured rat aortic smooth muscle cells. Effects of angiotensin II and vasopressin. *J. Biol. Chem.*, **260**: 7836~7842, 1985.
- 5) **Bruschi, G., Bruschi, M.E., Egolisti, G. and Borghetti, A.**: Myoplasmic Ca^{2+} -force relationship studied with fura-2 during stimulation of rat aortic smooth muscle. *Am. J. Physiol.*, **254**: H 840~H 854, 1988.
- 6) **Goldman, W.F., Wier, W.G. and Blaustein, M.P.**: Effects of activation on distribution of Ca^{2+} in single arterial smooth muscle cells. Determination with fura-2 and digital imaging microscopy. *Circ. Res.*, **64**: 1019~1029, 1989.
- 7) **Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y.**: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440~3450, 1985.
- 8) **Neylon, C.B., Hoyland, J., Mason, W.T. and Irvine, R.F.**: Spatial dynamics of intracellular calcium in agonist-stimulated vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.*, **259**: C 675~C 686, 1990.
- 9) **Williams, D.A., Fogarty, K.E., Tsien, R.Y. and Fay, F.S.**: Calcium gradients in single smooth muscle cells revealed by the digital imaging microscopy using fura-2. *Nature*, **318**: 558~561, 1985.
- 10) **Aiyar, N. Nambi, P., Stassen, F.L. and Croke, S.T.**: Vascular vasopressin receptors mediate phosphatidyl inositol turnover and calcium efflux in an established smooth muscle cell line. *Life Sci.*, **36**: 37~45, 1986.
- 11) **Chardonens, D., Lang, U., Capponi, A.M. and Vallotton, M.B.**: Comparison of the effects of angiotensin II and vasopressin on cytosolic free calcium concentration, protein kinase C activity, and prostacyclin production in cultured rat aortic and mesenteric smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **14**: Suppl. 6: S39~S44, 1989.
- 12) **Doyle, V.M. and Ruegg, U.T.**: Vasopressin induced production of inositol trisphosphate and calcium efflux in a smooth muscle cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **131**: 469~476, 1985.
- 13) **Nicotera, P., Orrenius, S., Nilsson, T. and Berggren, P.**: An inositol 1, 4, 5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} pool in liver nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 6858~6862, 1990.
- 14) **Ross, C.A., Meldolesi, J., Milner, T.A., Satoh, T., Supattapone, S. and Snyder, S.H.**: Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor localized to endoplasmic reticulum in cerebellar Purkinje neurons. *Nature*, **339**: 468~470, 1989.
- 15) **Seeman, P.**: The membrane actions of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rev.*, **24**: 583~655, 1972.
- 16) **Franks, N.P. and Lieb, W.R.**: Where do general anaesthetics act? *Nature*. **274**: 339~342, 1978.
- 17) **Franks, N.P. and Lieb, W.R.**: Molecular mechanisms of general anesthesia. *Nature*, **300**: 487~492, 1982.
- 18) **Ueda, I. and Kamaya, H.**: Molecular mechanisms of anesthesia. *Anesth. Analg.*, **63**: 929~945, 1984.
- 19) **Koblin, D.D.**: Inhaled anesthetics. Mechanism of action. *Anesthesia*. 3rd ed. (Ed: Miller, R.D.) Churchill Livingstone, New York, 51~83, 1990.
- 20) **Merin, R.G.**: Inhalational anesthetics and myocardial metabolism. *Anesthesiology*, **39**: 216~255, 1973.
- 21) **Gronert, G.A.**: Malignant hyperthermia. *Anesthesiology*, **53**: 395~423, 1980.

- 22) **Rusy, B.F. and Komai, H.:** Anesthetic depression of myocardial contractility: A review of possible mechanisms. *Anesthesiology*, **67**: 745~766, 1987.
- 23) **Nelson, T.E. and Sweo, T.:** Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Differing sensitivity to inhalational anesthetics. *Anesthesiology*, **69**: 571~577, 1988.
- 24) **Wheeler, D.M., Rice, R.T., Hansford, R.G. and Lakatta, E.G.:** The effect of halothane on the free intracellular calcium concentration of isolated rat heart cells. *Anesthesiology*, **69**: 578~583, 1988.
- 25) **Frazer, M.J. and Lynch, C.III.:** Halothane and isoflurane effects on Ca^{2+} fluxes of isolated myocardial sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology*, **77**: 316~323, 1992.
- 26) **Sprage, D.H., Yang, J.C. and Ngai, S.H.:** Effects of isoflurane and halothane on contractility and the cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate system in the rat aorta. *Anesthesiology*, **40**: 162~167, 1974.
- 27) **Longnecker, D.E. and Harris, P.D.:** Microcirculatory action of general anesthetics. *Fed. Proc.*, **39**: 1580~1583, 1980.
- 28) **Larach, D.R., Schuler, H.G., Skeehan, T.M. and Peterson, C.J.:** Direct effects of myocardial depressant drugs on coronary vascular tone. Anesthetic vasodilation by halothane and isoflurane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **254**: 58~64, 1990.
- 29) **Larach, D.R. and Schuler, H.G.:** Direct vasodilation by sevoflurane, isoflurane and halothane alters coronary flow reserve in the isolated rat heart. *Anesthesiology*, **75**: 268~278, 1991.
- 30) **Renzi, F. and Waud, B.E.:** Partition coefficients of volatile anesthetics in Krebs' solution. *Anesthesiology*, **47**: 300~305, 1977.
- 31) **Karaki, H.:** Ca^{2+} localization and sensitivity in vascular smooth muscle. *Trends. Pharmacol. Sci.*, **10**: 320~325, 1989.
- 32) **Tsien, R.Y., Rink, T.J. and Poenie, M.:** Measurement of cytosolic free Ca^{2+} in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, **6**: 145~157, 1985.
- 33) **Somlyo, A.P.:** Excitation-contraction coupling and the ultrastructure of smooth muscle. *Circ. Res.*, **57**: 497~507, 1985.
- 34) **Iino, M., Kobayashi, T. and Endo, M.:** Use of ryanodine for functional removal of the calcium store in smooth muscle cells of the guinea-pig. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **152**: 417~422, 1988.
- 35) **Somlyo, A.V., Bond, M., Somlyo, A.P. and Scarpa, A.:** Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**: 5231~5235, 1985.
- 36) **Iaizzo, P.A.:** The effects of halothane and isoflurane on intracellular Ca^{2+} regulation in cultured cells with characteristics of vascular smooth muscle. *Cell Calcium*, **13**: 513~520, 1992.
- 37) **Sill, J.C., Uhl, C., Eskuri, S., Van Dyke, R. and Tarara, J.:** Halothane inhibits agonist-induced inositol phosphate and Ca^{2+} signalling in A7r5 cultured vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, **40**: 1006~1013, 1991.
- 38) **Eckenhoff, R.G. and Shuman, H.:** Subcellular distribution of an inhalational anesthetics in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **87**: 454~457, 1990.

(平成5年2月15日受付)