

ラット大動脈におけるイソフルレンの収縮抑制作用と細胞内 Ca^{2+} 濃度の関係

土田 英 昭* 野月 笑美子* 山 蔭 道 明*
藤 田 智* 並 木 昭 義*

1. 要 旨

ラット摘出大動脈らせん状切片を用いて、高K刺激時の大動脈の等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度を同時に測定し、これらに及ぼすイソフルレンの影響を調べた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には、蛍光 Ca^{2+} 指示薬 fura-2 を用いた。32.8 mM の高K溶液で大動脈標本を刺激すると、等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加したが、イソフルレン負荷後は両者の増加が抑制された。この際、張力の増加はイソフルレンの濃度に依存して抑制され、また細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加も一部濃度依存性に抑制された。このことから、イソフルレンが高K刺激時のラット大動脈の収縮を抑制する機序には、細胞内への Ca^{2+} の流入を抑制する機構が関与しているものと推察された。

2. はじめに

吸入麻酔薬であるイソフルレンが強い血管拡張作用をもつことは、よく知られている¹⁻³⁾。しかし平滑筋の収縮-弛緩の重要な調節因子の1つである細胞内 Ca^{2+} 濃度に、イソフルレンがどのような影響を及ぼすのかはいまだよく知られていない。今回著者らはラットの摘出大動脈を用い、高濃度K刺激による筋の収縮にイソフルレンがどのような影響を及ぼすかについて、細胞内 Ca^{2+} 動態と共に測定し、検討した。

3. 研究方法

雄性 Sprague-Dawley ラット (250-300 g) の胸部大動脈をイソフルレン麻酔下に摘出し、栄養液中で長さ約 10 mm, 幅 2 mm のらせん状切片を作成した。内皮細胞は除去した⁴⁾。栄養液の組成 (mM) は、NaCl 136.9, KCl 5.4, glucose 5.5, NaHCO_3 23.8, CaCl_2 1.5, MgCl_2 1.0, EDTA 0.01 とした。高K溶液は栄養液の NaCl を等容量の KCl に置換して作成した。これらの溶液を 37°C において 95% 酸素, 5% 二酸化炭素の混合ガスで飽和させ、pH を 7.4 に調整した。次いで大動脈標本を室温で 5 μM の fura-2 の acetoxymethyl ester (fura-2/AM) を含む栄養液中に 3~5 時間つけ、fura-2 を負荷した。この際、栄養液中には、fura-2 の溶解度を増すために 0.05% cremophor EL を加えた。ついで fura-2/AM が細胞内で fura-2 に変化するとともに細胞外の余分な fura-2 を洗い流すため、37°C の栄養液中で 20-30 分間標本を洗浄した。

大動脈標本の等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には、日本分光社製 CAF-100 を用いた。図 1 に装置の概要を示した。標本は内膜側を下にして恒温槽に水平に固定した。キセノンランプから出た 340 nm と 380 nm の励起光は液槽の底面から標本に達し、標本からの 500 nm の蛍光は液槽底面を通過して光電子増倍管に達する。液槽内には常に混合ガスを通気し、イソフルレンの負荷もここを通して行った。

まず溶液中の K 濃度の変化により、大動脈標本の等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度がどのように変

*札幌医科大学麻酔学教室

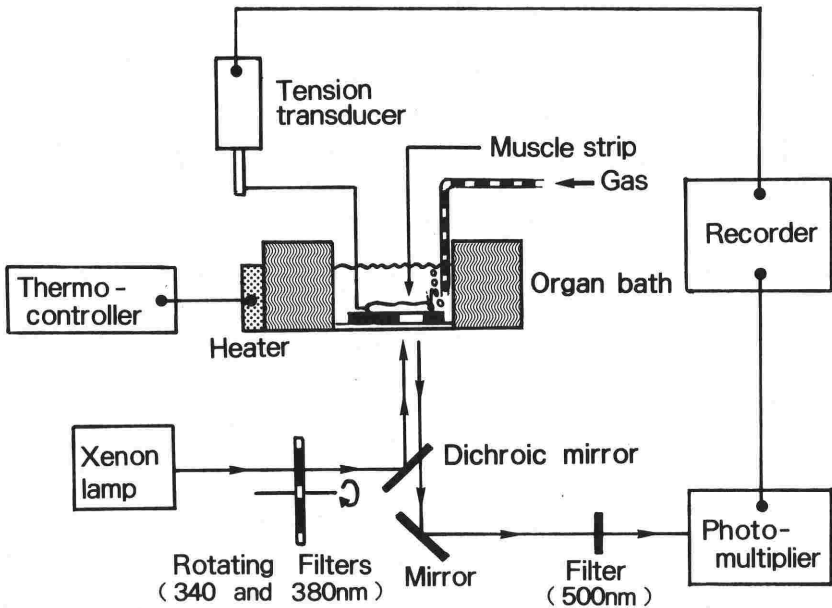


Fig. 1 Block diagram of the apparatus of fluorescence spectrometer designed for smooth muscle strip. See text for details.

化するかを測定した ($n=8$)。標本には 4 ml の栄養液中で 0.5 g の静止張力をかけた。ここに溶液中の K 濃度が 20.6, 32.8, 51.0, 64.1 mM となるように高 K 溶液を順次加えていき、この時の発生張力および 340 nm と 380 nm によって励起された 500 nm の蛍光の比 ($R_{340/380}$) を測定した。

次いで、高 K 刺激によって引き起こされた大動脈標本の等尺性張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に、イソフルレンがどのような影響を及ぼすかを検討した ($n=40$)。先の実験と同様に、まず 4 ml の栄養液中で標本に 0.5 g の静止張力をかけた。ついで高 K 溶液を 1 ml 加えて溶液内の K 濃度を 32.8 mM とし、この時の発生張力と $R_{340/380}$ を 100% とした。標本を通常の栄養液で洗浄し張力と $R_{340/380}$ が高 K 負荷前に戻った後に、0 から 4 % のイソフルレン (各々 $n=8$) の通気を開始した。8 分後、再び高 K 溶液を 1 ml 投与し、この時の発生張力と $R_{340/380}$ をイソフルレン負荷前と比較した。すなわちこの実験では高 K 溶液によって同一の標本を 2 度収縮させ、2 度目が 1 度目の何% になるかをイソフルレンを負荷していない群 (0%) と 1~4 % のイソフルレンを負荷した群とで比較した。なお栄養液中のイソフル

レン濃度は、ガスクロマトグラフィー (GC-12A, 島津製作所) にて測定した。

結果は全て平均士標準誤差で示した。平均値の差の検定は一元配置分散分析と Tukey のテストで行い、 $P<0.05$ の時を有意差ありとした。

4. 成績

図 2 に実験の一例を示した。大動脈標本を高 K 溶液 (32.8 mM) で刺激すると、340 nm の励起光による蛍光 (F_{340}) は増加し、380 nm の励起光による蛍光 (F_{380}) は減少した。その結果、それらの比である $R_{340/380}$ は増加した。これらの蛍光変化は張力の変化に先だって観察された。一方高 K 溶液を通常の栄養液に置換すると、 F_{340} は減少、 F_{380} は増加し、 $R_{340/380}$ は減少して基線に戻った。同様に張力も基線に戻った。

図 3 に種々の濃度の K 刺激による $R_{340/380}$ と発生張力の変化を示した。 $R_{340/380}$ 、張力ともに溶液中の K 濃度が 64.1 mM のときを 100% とした。溶液中の K 濃度が増加すると $R_{340/380}$ 、張力とも濃度依存性に上昇した。この際、 $R_{340/380}$ は K 濃度が 32.8 mM の時にほぼ 100% に近い値を示したのに対し、張力は 60% 程度でその後も増加した。

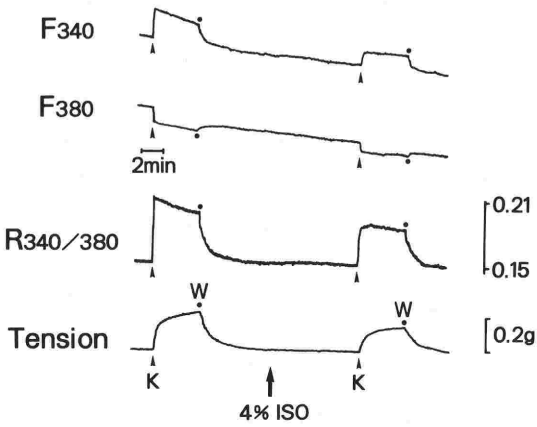


Fig. 2 Typical recordings of fluorescence and force development stimulated by 32.8 mM K^+ (K). F_{340} , the 500 nm emission at 340 nm excitation. F_{380} , the 500 nm emission at 380 nm excitation. $R_{340/380}$, an indicator of $[Ca^{2+}]_{cyt}$. The loading of 4% isoflurane (4% ISO) attenuated the changes in $R_{340/380}$ and muscle tension.

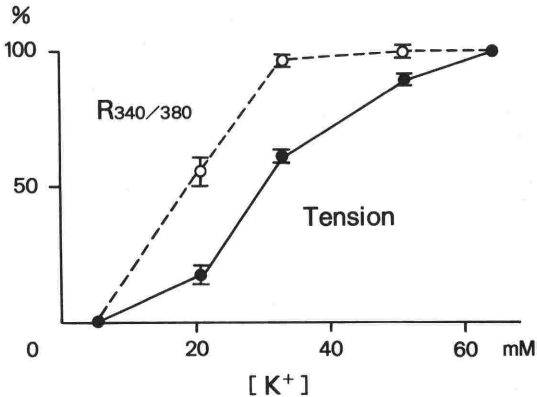


Fig. 3 Effect of cumulative addition of high K^+ -solution on $R_{340/380}$ (open circle) and muscle tension (closed circle). 100% represents the 64.1 mM K^+ -induced sustained increments in $R_{340/380}$ and tension. Values are expressed as mean \pm SE.

図4には高K刺激時の $R_{340/380}$ と張力の増加が、イソフルレンの負荷によりどのような影響を受けたかを示した。0%イソフルレン負荷時、すなわちイソフルレンを通気しなかった時には、発生張力は2度ともほぼ同じであった。しかし $R_{340/380}$ は、イソフルレンを負荷していないにも

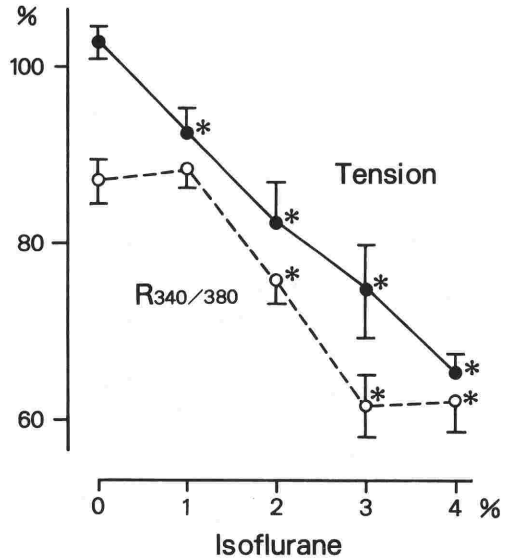


Fig. 4 Effect of isoflurane on 32.8 mM K^+ -stimulated increase in $R_{340/380}$ (open circle) and muscle tension (closed circle). 100% represents the K^+ -induced increase before isoflurane loading. Values are expressed as mean \pm SE. * $P < 0.01$, compared with 0% isoflurane.

かわらず2度目は1度目の87%程度まで減少した。1-4%のイソフルレンを負荷すると、張力はイソフルレンの濃度依存性に減少した。しかし $R_{340/380}$ は1%イソフルレンでは0%イソフルレンと差が見られず、その後濃度が増すにつれて減少したが、3%以上では再び変化が認められなくなった。なお1~4%イソフルレン通気時の栄養液中のイソフルレン濃度 (mg/dl) は、それぞれ 2.1 ± 0.3 , 6.1 ± 0.3 , 8.0 ± 0.6 , 10.9 ± 0.5 であった。

5. 考案

高濃度Kは細胞膜の電位依存性 Ca^{2+} チャンルを開口し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ平滑筋の張力を増す。著者らの最初の実験においても、溶液中のK濃度を増加させると、細胞内 Ca^{2+} 濃度の指標である $R_{340/380}$ と張力が濃度依存性に増加した。このことはイヌの気管平滑筋を用いた Ozaki らの結果⁵⁾とも一致する。また著者らが引

き続いてイソフルレンの実験に用いたK濃度(32.8 mM)は、細胞内 Ca^{2+} 濃度がほぼ最大になる濃度であることがわかる。

イソフルレンの濃度が0%, すなわち2度ともイソフルレンを負荷しなかった時、大動脈標本の張力変化は1度目、2度目ともほぼ同様であった。しかし細胞内 Ca^{2+} 濃度を示す $R_{340/380}$ の増加は、2度目は1度目の90%程度になった。この原因としては、2度目の収縮時に、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の流入が減少した可能性も否定はできない。しかし fura-2 は時間が経つにつれて細胞内から排出されたり励起光照射により分解される⁶⁾ ことから、1度目から2度目へと時間が経過するうちに細胞内の fura-2 の量が減少し、そのために生じた現象と考える方が妥当であろう。したがって今回の実験では、0%イソフルレン、すなわちイソフルレンを負荷していない対照実験の張力は約100%, $R_{340/380}$ は約90%としてその他の値と比較した。

イソフルレンは 32.8 mM のK刺激によるラット大動脈標本の収縮を、濃度依存性に抑制した。また $R_{340/380}$ の増加も一部濃度依存性に抑制しており、イソフルレンの収縮抑制作用には細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑える機構が関与しているものと推察される。

高K刺激による平滑筋収縮の機構として、①電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの開口による Ca^{2+} の細胞外から細胞内への流入、②増加した細胞内遊離 Ca^{2+} がカルモジュリンと結合し、ミオシン軽鎖キナーゼを活性化、③活性化されたミオシン軽鎖キナーゼがミオシン軽鎖をリン酸化し、これによってアクチン-ミオシンの相互作用が起り筋が収縮する、というミオシンリン酸化説が最も広く受け入れられている⁷⁾。イソフルレンは細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑制していることから、①の機序、すなわち電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介して、 Ca^{2+} の細胞内流入を抑制している可能性が考えられる。しかし今回の研究からは、②、③の細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響されない収縮抑制の機構の関与も除外することはできない。

吸入麻酔薬が血管平滑筋の収縮力を抑制することは従来から報告されている¹⁻³⁾ が、そのもたらされる機序に関して、最近になって細胞内 Ca^{2+} 動態に吸入麻酔薬が影響を及ぼすことが知られて

きた。Fura-2 を用いた培養平滑筋細胞の実験で、ハロセンは静止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させると同時に、バゾプレッシンによる細胞内 Ca^{2+} の増加を抑制する⁸⁾ ことが報告されている。また $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いた培養平滑筋細胞の実験でも、ハロセンは $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内流入を抑制する⁹⁾ とされている。イソフルレンでの報告は見られないものの、イソフルレンもハロセンと同様に Ca^{2+} の細胞外からの流入を抑制することが示唆される。また Sprague ら¹⁾ は、イソフルレンがラット大動脈組織中の cAMP 濃度を上昇させることを報告している。cAMP の増加は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を抑える¹⁰⁾ と共に、cAMP 依存性蛋白質キナーゼがミオシン軽鎖キナーゼの活性を低下させ、筋の収縮を抑制する可能性が示唆されている¹¹⁾。このことはイソフルレンが、細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存しない収縮抑制機構を有する可能性を示している。

血管平滑筋において、吸入麻酔薬の細胞内 Ca^{2+} 動態と張力変化に与える影響を同時に検討した報告は見当たらない。しかし両者の関係を明らかにすることは、吸入麻酔薬の血管拡張作用の機序を解明する上で非常に重要である。今回の結果からイソフルレンの血管拡張作用には、一部、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の細胞内への流入を抑制する機構が関与していることが推察された。イソフルレンは受容体作動薬による血管収縮も抑制する^{1,3)} が、これにも電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介した Ca^{2+} の流入の抑制が一部関与しているものと考えられる。しかしイソフルレンがどのようにして細胞内への Ca^{2+} 流入や収縮蛋白質を抑制するかについては、今後の解明が必要である。

6. ま と め

蛍光 Ca^{2+} 指示薬 fura-2 を用いて、高K刺激時のラット大動脈切片の等尺性張力にイソフルレンがどのような影響を及ぼすかを、細胞内 Ca^{2+} 動態と共に観察した。イソフルレンは大動脈標本の等尺性張力を濃度依存性に抑制した。また細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加も、一部、濃度依存性に抑制した。イソフルレンの血管拡張作用には、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑制する機構が関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) Sprague, D. H., Yang, J. C., 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.
- 2) Hatano, Y., Nakamura, K., Yakushiji, T. et al.: Comparison of the direct effect of halothane and isoflurane on large and small coronary arteries isolated from dogs. *Anesthesiology* 73: 513-517, 1990.
- 3) Witzeling, T. M., Sill, J. C., Hughes, J. M., et al.: Isoflurane and halothane attenuate coronary artery constriction evoked by serotonin in isolated porcine vessels and in intact pigs. *Anesthesiology* 73: 100-108, 1990.
- 4) Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (Lond.)* 288: 373-376, 1980.
- 5) Ozaki, H., Kwon, S. C., Tajimi, M., et al.: Changes in cytosolic Ca^{2+} and contraction induced by various stimulants and relaxants in canine tracheal smooth muscle. *Pfluger. Arch.* 416: 351-359, 1990.
- 6) 唐木英明: 蛍光カルシウム指示薬の実験基礎. *実験医学* 7: 626-631, 1989.
- 7) 池辺光男: ミオシンのリン酸化と収縮抑制. *実験医学* 6: 1372-1379, 1988.
- 8) Szocik, J. F., Sheth, N., Kowal, A. G., et al.: Halothane effects on intracellular calcium pools in cultured vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* 71: A249, 1989.
- 9) Murray, T. R., Macarak, E. J., Marshall B. E.: Halothane inhibits calcium influx in vascular smooth muscle cells. *Anesthesiology* 71: A251, 1989.
- 10) Abe, A., Karaki, H.: Effect of forskolin on cytosolic Ca^{++} level and contraction in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 895-900, 1989.
- 11) Conti, M. A., Adelstein, R. S.: The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by catalytic subunit of 3'-5'-cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 256: 3178-3181, 1981.

Inhibitory Effect of Isoflurane on Cytosolic Ca^{2+} Increase and Contraction in Vascular Smooth Muscle of Rat Aorta

Hideaki Tsuchida, Emiko Notsuki, Michiaki Yamakage,
Satoshi Fujita, and Akiyoshi Namiki

Department of Anesthesiology, Sapporo Medical College

We examined the effects of isoflurane on cytosolic Ca^{2+} levels ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) using a fluorescent Ca^{2+} indicator, fura-2, measured simultaneously with muscle tension in rat aortic smooth muscle. High K-solution (32.8 mM) increased the muscle tension and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ both before and during the loading of isoflurane. However, the changes in muscle tension and

$[Ca^{2+}]_{cyt}$ were significantly attenuated during isoflurane loading. The inhibitory effects of isoflurane on the increase in muscle tension and partly in $[Ca^{2+}]_{cyt}$ were concentration-dependent. It is likely that the vasodilating effect of isoflurane is attributable in part to the decrease in $[Ca^{2+}]_{cyt}$.