

吸入麻酔薬の血管平滑筋へ及ぼす影響 — 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動 —

土田 英昭*, 南波 仁*, 関 純彦*
田中 悟*, 並木 昭義*

はじめに

吸入麻酔薬は交感神経、血管内皮細胞、細胞表面のカルシウムやポタシウムチャンネルなど、種々の経路を通じて血管平滑筋の収縮、弛緩に影響を及ぼす。一般的に吸入麻酔薬は *in vivo* で血管拡張性に働くが、*in vitro* では逆に血管収縮を起こすこともある。更には血管内皮細胞の存在のいかんにより、吸入麻酔薬の働きが若干異なることが知られている。われわれは吸入麻酔薬の血管平滑

筋に対する直接作用を、*in vitro* において細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の変動を通じて研究しているので、その研究の一端を報告する。

細胞内 Ca 濃度測定法

われわれは材料にラット大動脈らせん状切片を用いている。内皮細胞は通常除去しているが、一部の実験では残したままで実験を行っている。この標本に細胞内 Ca 指示薬である fura-2 を負荷し、図 1 に示したように日本分光社製 CAF-100 を用

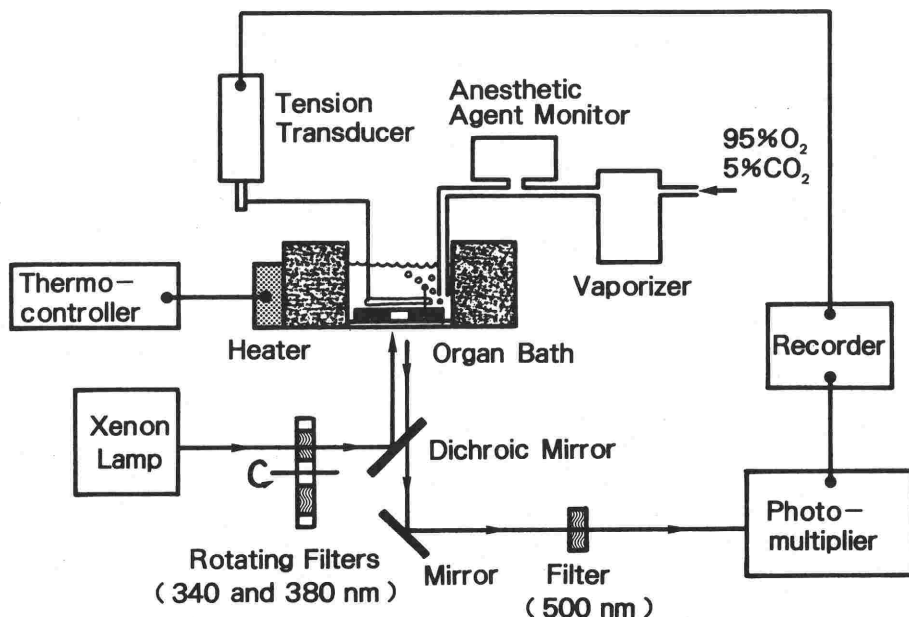


図 1 平滑筋組織の fura-2-Ca 蛍光測定のための装置。文献 2 を参考に改図。

*札幌医科大学医学部麻酔学講座

いて $[Ca^{2+}]_i$ と張力を同時に測定、記録した。恒温槽内には95%酸素、5%二酸化炭素を通過しており、吸入麻酔薬の投与もここを通して行った。吸入麻酔薬の濃度はガス層における濃度で表示しており、栄養液中の吸入麻酔薬濃度は別にガス・クロマトグラフィーで測定した。

$[Ca^{2+}]_i$ の測定には、恒温槽の底面より標本に340 nm と380 nm の光を照射し、これから発する500 nm の蛍光 (F_{340} と F_{380}) を光電子増倍管で計測し、これらの比の値 (F_{340}/F_{380} 、ここでは R_{340}/R_{380} と示す) を算出した。培養細胞と違い平滑筋組織は結合組織などを含み、それ自体が大きな自家蛍光を持つ。またエネルギー代謝と連動した蛍光物質もあるため、平滑筋組織は $[Ca^{2+}]_i$ の絶対値の計算には不向きであるとされている^{1,2)}。このためわれわれは、 R_{340}/R_{380} の相対変化を求めることにより $[Ca^{2+}]_i$ 動態を推測した。

吸入麻酔薬がラット大動脈平滑筋の収縮に及ぼす影響

実験は、代表的吸入麻酔薬ハロタン、イソフルランが血管平滑筋の収縮にどのような影響を及ぼすかを、吸入麻酔薬を前負荷した場合と後負荷した場合とに分けて調べた。またカルシウム拮抗薬であるベラパミルと吸入麻酔薬との相互作用から、受容体作動薬であるノルエピネフリン、プロスタグランディン $F_{2\alpha}$ 収縮時の吸入麻酔薬の作用を検討した。また、血管内皮細胞を残した状態での吸入麻酔薬の影響も検討した。

1. 吸入麻酔薬自体が $[Ca^{2+}]_i$ に及ぼす影響³⁾

まず、吸入麻酔薬が血管平滑筋にどのような影響を及ぼすかを、静止張力のみを負荷した標本で検討した。Fura-2を負荷した血管平滑筋にハロタン、イソフルランを投与すると、 F_{340} は増加し F_{380} は減少した (図2)。その結果 $[Ca^{2+}]_i$ を示す R_{340}/R_{380} は持続性に増加した。これに対し張力は、3%以上の高濃度ハロタン投与時に上昇が認められることもあったが、その作用は一過性であった。吸入麻酔薬の $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用は濃度依存性であり、イソフルランに比較するとハロタンでより強い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用が認められた。またこの作用は、fura-2を負荷していない平滑筋では認められなかったことから、これは吸入麻酔薬が fura-2 の蛍光に影響を与えているのではな

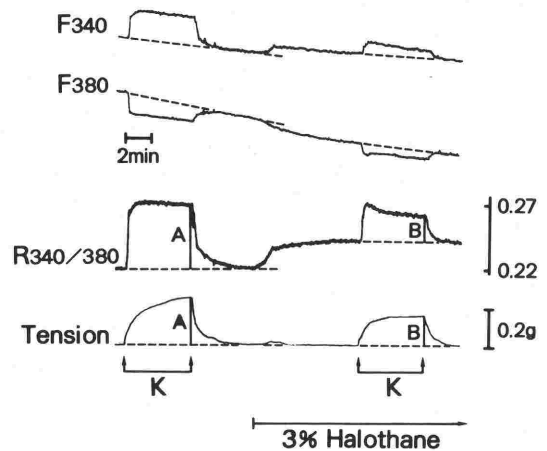


図2 Fura-2-Ca法による実際の $[Ca^{2+}]_i$ と張力の測定記録 (文献3より)。高Kの負荷により340 nmの励起光による蛍光 (F_{340}) は上昇し、380 nmの励起光による蛍光 (F_{380}) は減少する。その結果、 F_{340} と F_{380} の比 (R_{340}/R_{380}) は上昇する。この R_{340}/R_{380} が $[Ca^{2+}]_i$ に対応するとされている。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に引き続いて張力が徐々に上昇する。

く、吸入麻酔薬が何らかの作用で $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させているものと推察された。

吸入麻酔薬の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用は、外液のCaを無くしても観察されたので、細胞内からのCa遊離が関与しているものと考えられた。更にこの作用は、カフェインとリアノジンで細胞内Ca貯蔵庫のうち、カフェイン感受性のチャネルからのCa放出を起こした後にも認められた。従って吸入麻酔薬によるCa放出は、カフェイン感受性チャネル以外からも起こることが推察された。

2. 吸入麻酔薬投与中の血管収縮薬の作用³⁾

吸入麻酔薬を前投与した状態で32.8 mM KClもしくは30 nM ノルエピネフリンで標本を収縮させると、吸入麻酔薬を投与していないときと比較して、張力と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が有意に抑えられた (図2)。 $[Ca^{2+}]_i$ と張力の抑制は吸入麻酔薬の濃度依存性であり、なおかつ両者の抑制は平行して起こった (図3)。このことは、吸入麻酔薬による平滑筋収縮抑制作用に $[Ca^{2+}]_i$ が大きく関わっていることを推測させる。また、KCl収縮時の方がノルエピネフリン収縮時よりも吸入麻酔薬による抑制が大きかったことから、吸入麻酔薬による $[Ca^{2+}]_i$ 減少作用には、細胞膜の電位依存性Caチャネルの抑制作用が大きく関与してい

ると考えられた。一方、KCl 収縮時に Ca チャネルアゴニストである Bay K 8644 を投与すると、吸入麻酔薬によって抑えられた $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は吸入麻酔薬投与前まで回復したが、発生張力はいぜん抑制されたままであった。このことから、吸入麻酔薬による平滑筋収縮抑制作用には、収縮蛋白の Ca 感受性の低下も関与していると推察された。

3. 血管平滑筋収縮中に吸入麻酔薬を投与した場合⁴⁾

続いて、血管収縮中に吸入麻酔薬を投与するとどのような変化が起こるかを検討した。KCl 収縮時にハロタンを投与すると、一過性の張力と $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた後、両者とも徐々に減少した (図 4 A)。この一過性の変化はイソフルランでは観察されなかった (図 4 B)。同様にノルエピネフリンやプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ 収縮時に、ハロタンやイソフルランを投与しても観察されなかった (図 4 C)。しかし、電位依存性 Ca チャネル拮抗薬であるベラパミルを前投与した標本をノルエピネフリンで収縮させ、ここに吸入麻酔薬を投与すると、やはり一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と収縮張力の亢進が見られた。一方、ベラパミルを前投与した標本をプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で収縮させ、ここに吸入麻酔薬を投与しても、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と張力の亢進は見られなかった。

KCl 収縮時とノルエピネフリン収縮時にハロタンとイソフルランを投与し、その 8 分後の値を投与前値と比較すると、両麻酔薬とも $[Ca^{2+}]_i$ と張力を濃度依存性に抑制した (図 5)。ノルエピネフリン収縮時には、吸入麻酔薬を前投与したときと同様、吸入麻酔薬の $[Ca^{2+}]_i$ と張力に対する抑制作用は平行におこった。これに対し、KCl 収縮時には 2 つの線が交差すること、すなわち $[Ca^{2+}]_i$ の抑制よりも張力の抑制の方が強く起こることがわかった。すなわち今回も、吸入麻酔薬は収縮蛋白の Ca 感受性を抑制していることが疑われた。

吸入麻酔薬の収縮蛋白 Ca 感受性に及ぼす影響を検討するために、Ca 拮抗薬であるベラパミルを用いて実験を行った。ベラパミルは電位依存性 Ca チャネルを抑制するとともに、細胞内 Ca 貯蔵庫からの Ca 放出を抑え、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する。しかし収縮蛋白の Ca 感受性には影響しな

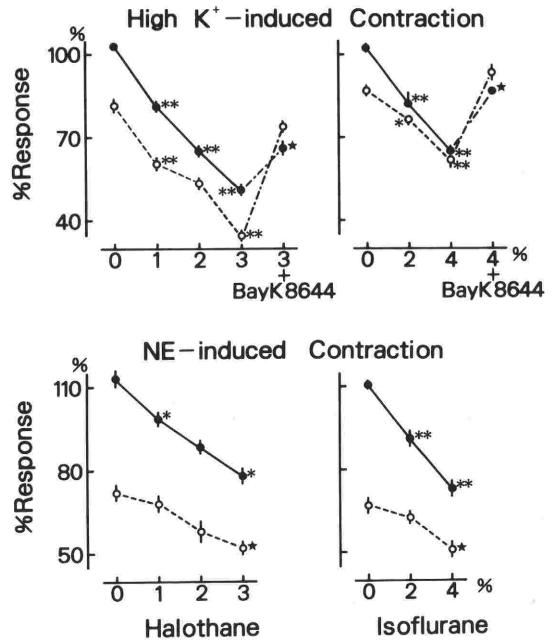


図 3 ハロタンまたはイソフルラン投与下に、32.8 mM K, ノルエピネフリンで標本を収縮させた時の張力と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇 (文献 3 より). 100% の値はいずれも、吸入麻酔薬投与前の 32.8 mM K による張力と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とした。吸入麻酔薬はいずれも濃度依存性に張力と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する。3% ハロタンまたは 4% イソフルラン存在下で、32.8 mM K による収縮中に Ca チャネルアゴニストである Bay K 8644 を投与すると、 $[Ca^{2+}]_i$ は吸入麻酔薬を投与していない時と同様のレベルまで上昇するが、張力は抑制されたままであった。

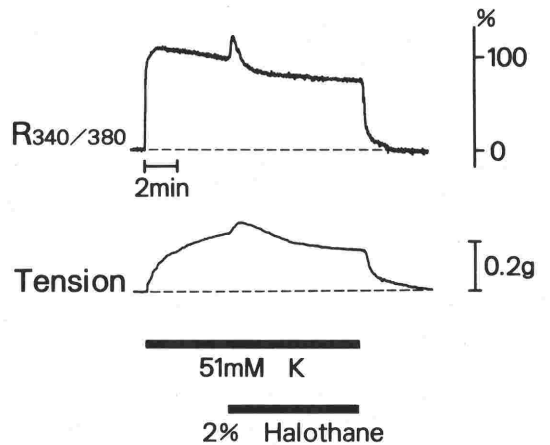


図 4 A. 51 mM K による収縮中に 2% ハロタンを投与したときの記録。 $[Ca^{2+}]_i$ と張力の一過性の上昇が見られる。

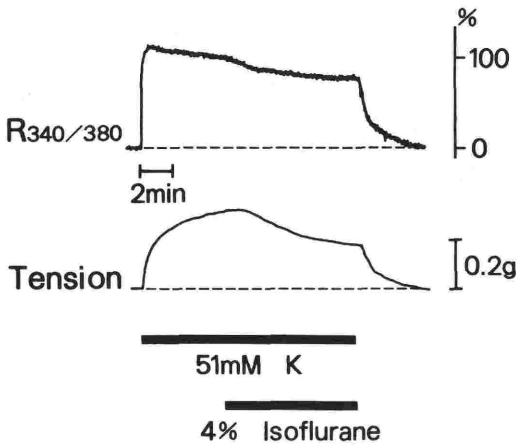


図4 B. 51 mM Kによる収縮中に4%イソフルランを投与したときの記録. ハロタンと違い, 一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が見られない.

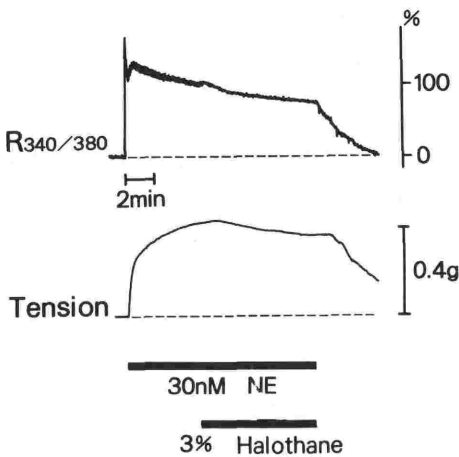


図4 C. 30 nM ノルエピネフリンによる収縮中の3%ハロタンを投与したときの記録.

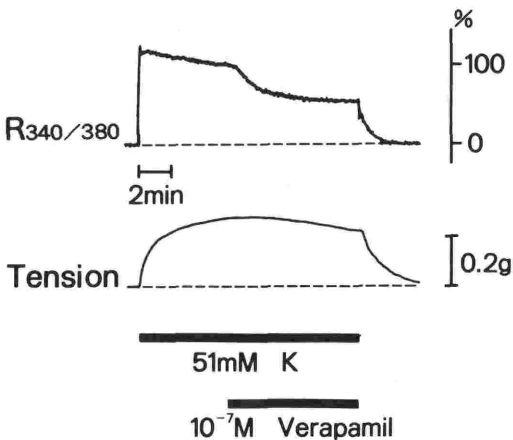


図4 D. 51 mM Kによる収縮中に100 nM ベラパミルを投与したときの記録. いずれも文献4より.

いとされている⁵⁾. ベラパミルを KCl 収縮時に投与すると, 吸入麻酔薬同様, $[Ca^{2+}]_i$ と張力を抑制する (図4 D). しかし, $[Ca^{2+}]_i$ と張力の関係を吸入麻酔薬とベラパミル間で比較してみると, ノルエピネフリン収縮時にはベラパミルと吸入麻酔薬の作用間で有意な差がなかったのに対し, KCl 収縮時には有意差があった (図6). すなわち KCl 収縮時には, 吸入麻酔薬は明らかに収縮蛋白の Ca 感受性を低下する. これに対しノルエピネフリン収縮時には, 吸入麻酔薬の Ca 感受性低下作用は明らかではなかった. 血管収縮を引き起こす薬剤によって, 吸入麻酔薬の作用に違いが起きる原因は不明である. これはノルエピネフリンが収縮蛋白の Ca 感受性を亢進するからではないようである. 何故なら, 同様に収縮蛋白の Ca 感受性を亢進するプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ で血管を収縮させた際には, 吸入麻酔薬が収縮蛋白の Ca 感受性を低下させるという実験結果をわれわれは得ているからである.

4. ハロタンによる $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇の原因⁴⁾

われわれは, ハロタンによる一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と張力の亢進の原因として, ハロタンが細胞内の Ca 貯蔵庫から Ca を放出する作用があると仮定した. 平滑筋細胞内には Ca によって開口する Ca-induced Ca release (CICR) チャネルと, イノシトール 3 リン酸 (IP₃) によって開口する IP₃-induced Ca release (IICR) チャネルがあると言われている⁶⁾. われわれは CICR チャネルをカフェインで, IICR チャネルをノルエピネフリンを用いて開口させ, このときの Ca 放出に及ぼすハロタンとイソフルランの影響を観察した. 実験は外液の Ca を無くした状態で行った. まず標本を 51 mM KCl で収縮させた後, 外液の Ca 濃度をゼロとし, $[Ca^{2+}]_i$ が基線に復帰した時点で吸入麻酔薬と 4 mM もしくは 20 mM カフェイン, あるいは 3 nM もしくは 100 nM ノルエピネフリンをほぼ同時に投与した (図7). その結果, ハロタンは 4 mM カフェインによる $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇を濃度依存性に亢進させることがわかった (図8). しかし両麻酔薬ともに, カフェイン投与によっておきる Ca トランジエントが基線に復帰するまでの時間を有意に延長した. したがってハロタン投与後の一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には,

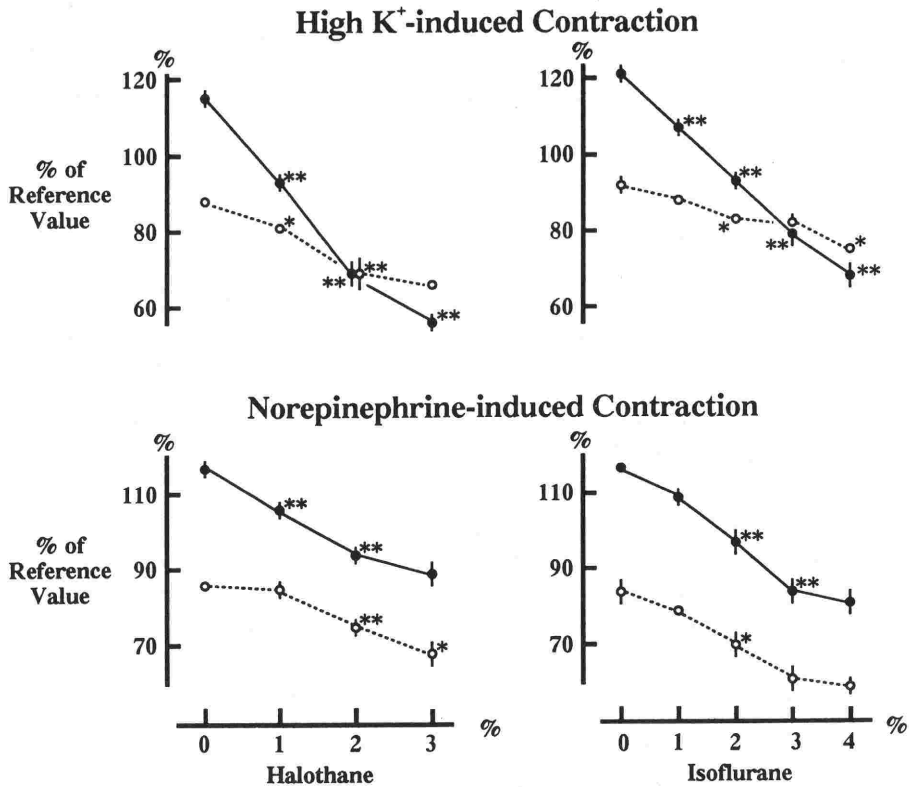


図5 51 mM K または 30 nM ノルエピネフリンで収縮中にハロタンまたはイソフルランを投与したときの張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化 (文献 4 より). 100% の値は吸入麻酔薬投与直前の張力および $[Ca^{2+}]_i$ とした.

カフェインによって開口する CICR チャネルが関与している可能性がある. しかしその後の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には, CICR チャネル以外のチャネルが関与している可能性も否定できない. このことは先の実験で, リアノジン, カフェインで処理した標本に対してもハロタンが $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させたことと一致する.

内皮依存性の血管拡張に対するハロタンの影響

吸入麻酔薬は内皮依存性の血管拡張作用にも影響を及ぼすことが知られている⁷⁻¹⁰⁾. しかしその作用部位は未だ合意を得ていない. われわれは内皮細胞を残したままのラット大動脈標本で, 内皮細胞側を下に向けた状態で $[Ca^{2+}]_i$ と発生張力の動きを観察した.

内皮細胞を残したままの標本をノルエピネフリンで収縮させると, $[Ca^{2+}]_i$ と張力が上昇する (図 9 A). ここにアセチルコリン受容体アゴニストであるカルバコールを投与すると, $[Ca^{2+}]_i$ の上

昇と共に血管は拡張した. 一方, 内皮細胞を除去した標本では, ノルエピネフリンによって $[Ca^{2+}]_i$ と張力は上昇するが, カルバコールを投与しても何の変化も現れなかった (図 9 B). すなわちラット大動脈血管平滑筋に対し, カルバコール自体は何の作用もしないことがわかる. このことは, 内皮細胞を残した標本において, カルバコールは内皮細胞のアセチルコリン受容体を刺激し, これによって内皮の $[Ca^{2+}]_i$ 濃度が上昇し, 内皮依存性拡張物質が産生され, 血管が拡張したものと考えられる¹¹⁾.

さてここにハロタンを投与すると, やはり $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こる. この状態でノルエピネフリンに引き続きカルバコールを投与すると, 血管内皮細胞内の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制されるとともに内皮依存性の拡張が抑制された (図 9 A). 一方, NO 合成阻害薬である LnAME を用いてハロタンと同程度の血管拡張抑制をおこすと, $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制はほとんど見られず, ハロタ

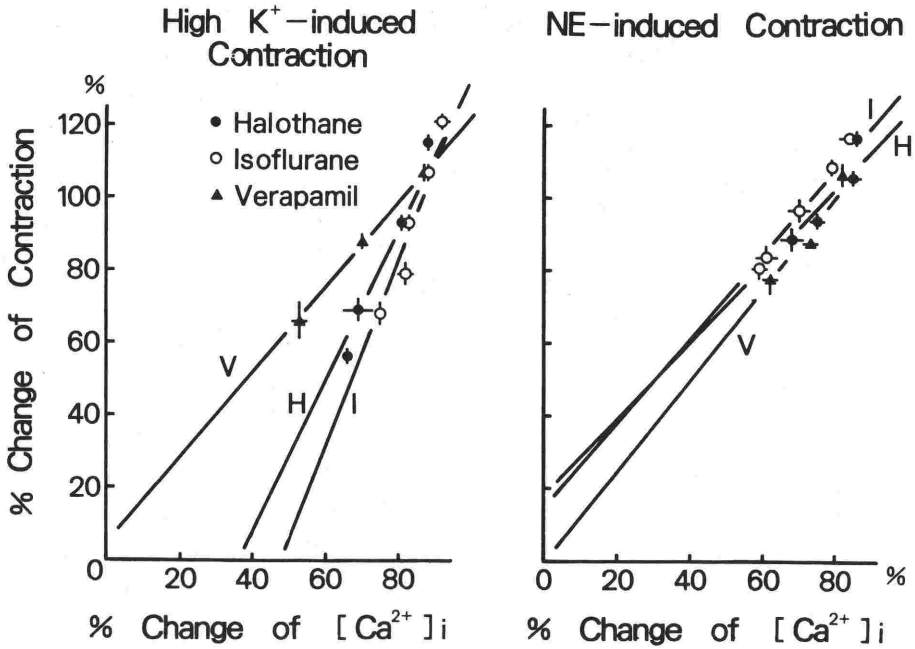


図6 ハロタン、イソフルラン、ベラパミルによる $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係 (文献4を著者の了解を得て改図). いずれの薬剤も、濃度上昇に伴い $[Ca^{2+}]_i$ と張力が減少し、両者の間に直線関係が生まれる. 51 mM Kによる収縮の時は、吸入麻酔薬とベラパミルの直線間に有意の差があるが、30 nM ノルエピネフリンによる収縮時には両者の間に差がない.

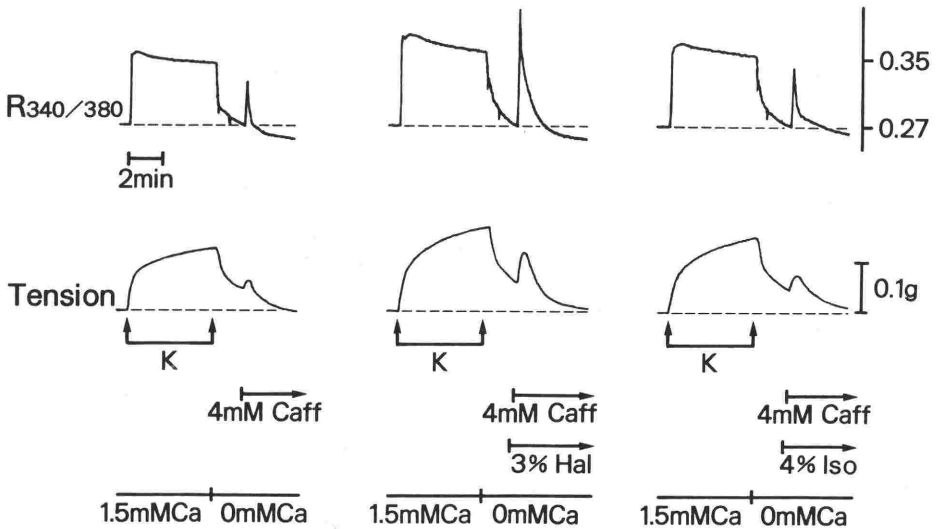


図7 A. 4 mM カフェインによる Ca 放出に及ぼす 3% ハロタン, 4% イソフルランの影響. 標本はまず外液の Ca 存在下に 51 mM K で収縮させ、この時の $[Ca^{2+}]_i$ と張力の大きさを 100% とした. ついで Ca 濃度をゼロにした外液と置換し、 $[Ca^{2+}]_i$ が基線に復帰するのを待って吸入麻酔薬とカフェインをほぼ同時に投与した.

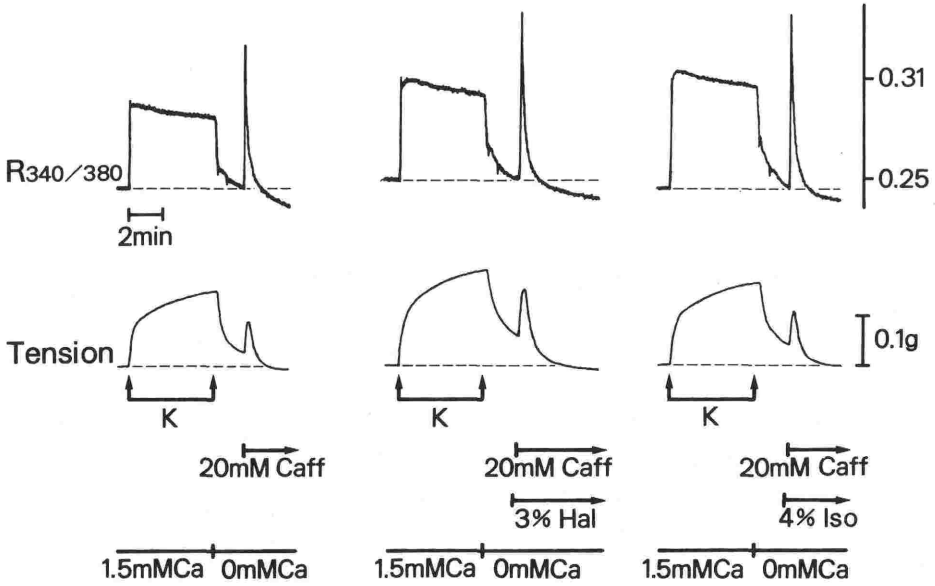


図7 B. 20 mM カフェインによる Ca 放出に及ぼす 3% ハロタン, 4% イソフルランの影響. いずれも文献4より.

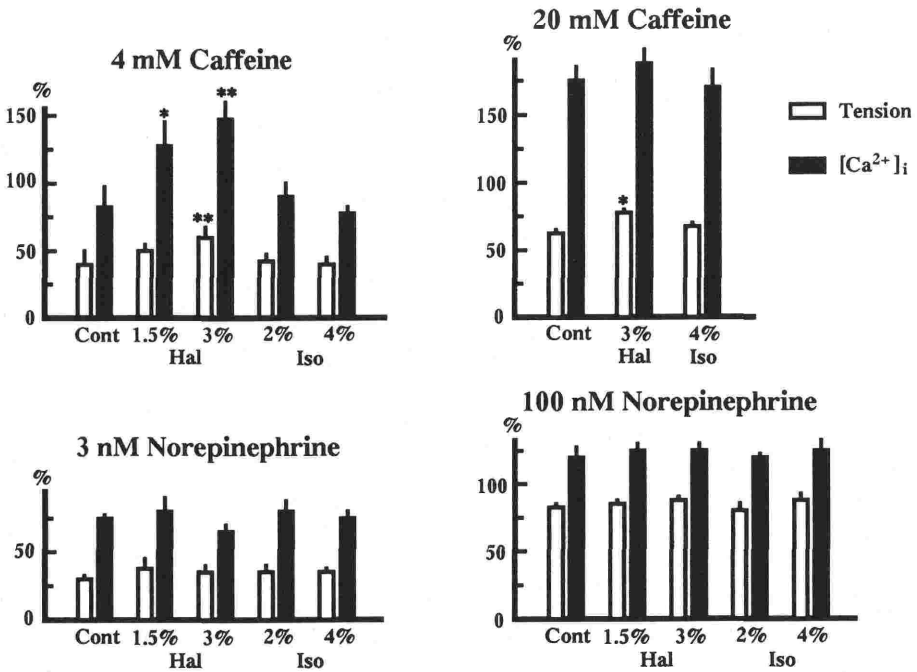


図8 カフェイン, ノルエピネフリンによる Ca 放出に及ぼすハロタン, イソフルランの影響 (文献4より). ハロタンは濃度依存性に 4 mM カフェインによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を亢進した.

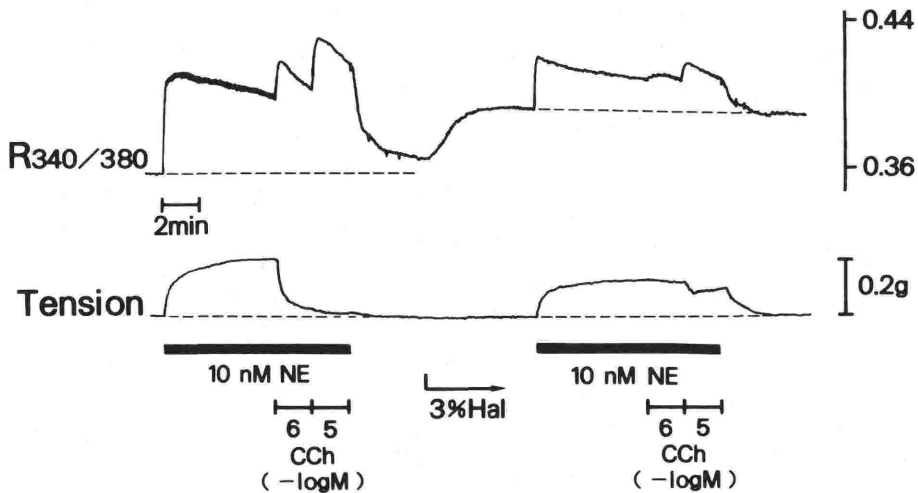


図9 A. 内皮細胞を残した標本での $[Ca^{2+}]_i$ と張力の変化. 10 nM ノルエピネフリンの投与により $[Ca^{2+}]_i$ と張力は上昇する. カルバコールの投与により $[Ca^{2+}]_i$ は更に上昇するが張力は減少した. 3%ハロタンの存在下では, カルバコールによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と張力の低下が抑制された.

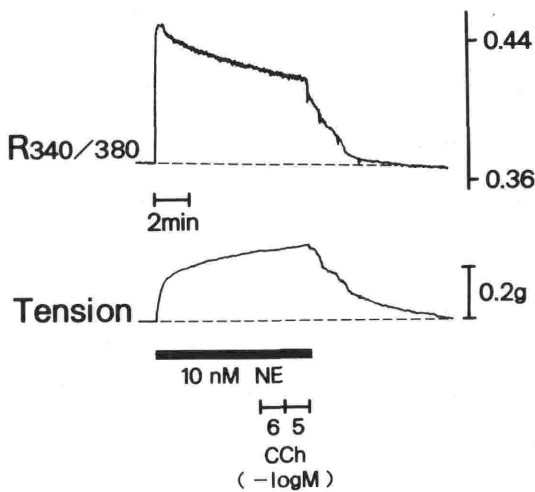


図9 B. 内皮細胞を剝離した標本での $[Ca^{2+}]_i$ と張力の変化. 両者ともカルバコール投与による変化を受けない.

ンとは $[Ca^{2+}]_i$ に対する作用が異なった(図9 C). すなわちハロタンを投与するとそれ自体 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させるが, ノルエピネフリンによる $[Ca^{2+}]_i$ と収縮張力の上昇を抑制し, なおかつカルバコールによる $[Ca^{2+}]_i$ の上昇も小さくした.

ニトログリセリンは内皮非依存性の拡張物質であり, NOと同様に血管平滑筋内のcGMP濃度を増加させる. ニトログリセリンを内皮細胞を除去した標本に投与すると, やはり濃度依存性に血管

拡張を起こす(図9 D). ハロタンはこのニトログリセリンの血管拡張作用を濃度依存性に抑制し, 同時に $[Ca^{2+}]_i$ の変化も抑制した. すなわちハロタンは, 血管内皮細胞と血管平滑筋の両方の $[Ca^{2+}]_i$ 動態に影響して, 内皮依存性の血管拡張を抑制していることが推察された. しかしわれわれの実験は, 内皮細胞から産生されるNOを直接測定しているわけではないので, NO産生に吸入麻酔薬がどのような影響を及ぼしているかは不明である.

まとめ

吸入麻酔薬の血管平滑筋に対する直接作用を検討する際, $[Ca^{2+}]_i$ を同時測定することはその作用機序の解明に大いに役立つ. 吸入麻酔薬は血管平滑筋弛緩作用を持つ. この作用は $[Ca^{2+}]_i$ を低下させる作用と, 収縮蛋白のCa感受性低下作用とに分けることができる. また吸入麻酔薬, 特にハロタンは, 一過性に平滑筋張力を増加させる作用を持つ. この作用には, 細胞内のCa貯蔵庫, 特にカフェインによって開くCaチャンネルが関与していると推察された. 吸入麻酔薬は血管収縮のみでなく, 血管拡張に対しても拮抗的に作用する. 特に, 内皮依存性の血管拡張に対してハロタンは, 内皮細胞及び血管平滑筋のカルシウム動態に影響し, 血管拡張作用を抑制することが明らかとなっ

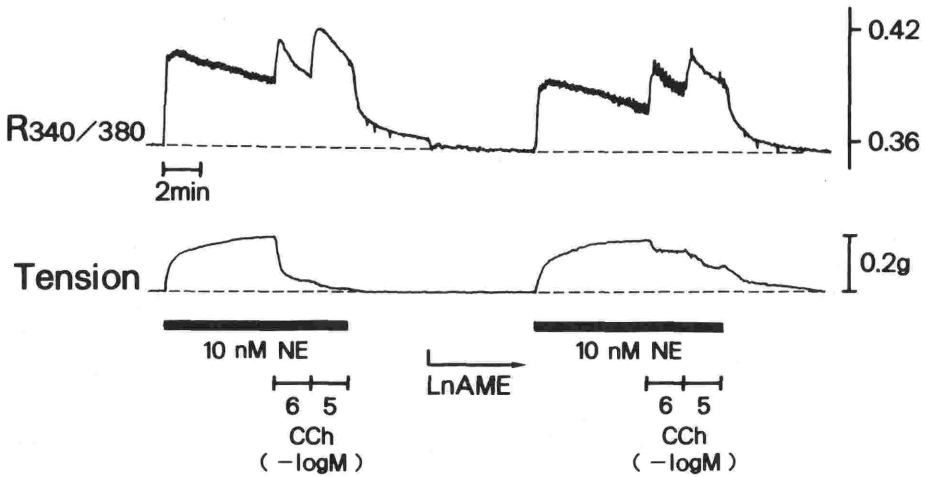


図9 C. 内皮細胞を残した標本での LnAME の影響. LnAME は張力の減少を抑制したが, $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は抑制しなかった.

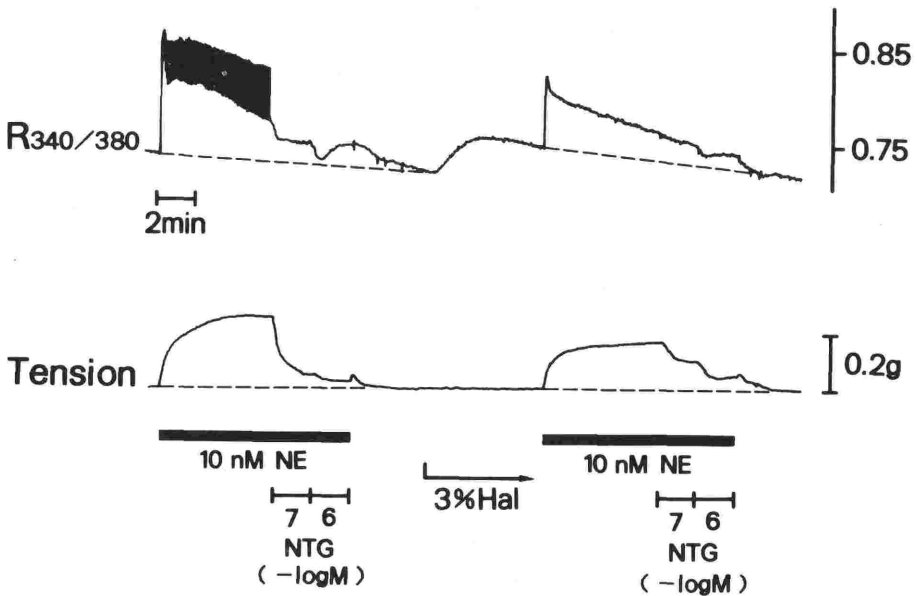


図9 D. 内皮細胞を剝離した標本でのニトログリセリンの拡張作用. ノルエピネフリンで収縮させた標本に対し, ニトログリセリンは濃度依存性に $[Ca^{2+}]_i$ と張力を抑制した. ハロタンはニトログリセリンの作用を抑制した.

た.
最後になったが, われわれの研究を発表する機会を与えてくださった第16回日本循環制御医学会会長森健次郎教授と, 座長の労をお取りくださった日本医大小川龍教授に深謝する.

文 献

- 1) 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
- 2) 尾崎 博, 唐木英明: 平滑筋収縮張力と細胞内カルシウム濃度の同時測定法 (Fura-2). 実験医学 7: 650-654, 1989

- 3) Tsuchida H, Namba H, Yamakage M, et al : Effects of halothane and isoflurane on cytosolic calcium concentrations and contraction in the vascular smooth muscle of the rat aorta. *Anesthesiology* 78 : 531-540, 1993
- 4) Tsuchida H, Namba H, Seki S, et al : Role of intracellular Ca^{2+} pools in the effects of halothane and isoflurane on vascular smooth muscle contraction. *Anesth Analg* 78 : 1067-76, 1994
- 5) Kobayashi S, Gong MC, Somlyo AV, et al : Ca^{2+} channel blockers distinguish between G protein-coupled pharmacomechanical Ca^{2+} release and Ca^{2+} sensitization. *Am J Physiol* 260 : C364-C370, 1991
- 6) Iino M : Calcium dependent inositol triphosphate-induced calcium release in the guinea-pig taenia caeci. *Biochem Biophys Res Commun* 142 : 47-52, 1987
- 7) Loeb AL, Longnecker DE, Williamson JR : Alteration of calcium mobilization in endothelial cells by volatile anesthetics. *Biochem Pharmacol* 45 : 1137-42, 1993
- 8) Nakamura K, Terasako K, Toda H, et al : Mechanisms of inhibition of endothelium-dependent relaxation by halothane, isoflurane, and sevoflurane. *Can J Anaesth* 41 : 340-346, 1994
- 9) Blaise G, To Q, Parent M, et al : Does halothane interfere with the release, action, or stability of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide? *Anesthesiology* 80 : 417-426, 1994
- 10) Hart JL, Jing M, Bina S, et al : Effects of halothane on EDRF/cGMP-mediated vascular smooth muscle relaxations. *Anesthesiology* 79 : 323-331, 1993
- 11) Sato K, Ozaki H, Karaki H : Differential effects of carbachol on cytosolic calcium levels in vascular endothelium and smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 255 : 114-119, 1990