

イソフルランはカルシウム拮抗薬抵抗性チャネルからのカルシウム流入を増加させる

北村里恵*, 榎泰二郎*, 平田眞一*
中村久美*, 角山正博*, 森健次郎*

要 旨

イソフルランの血管平滑筋収縮作用機序を解明するため、カルシウム感受性蛍光色素 Fura PE3 を用いた細胞内カルシウム濃度と張力の同時測定、および $^{45}\text{Ca}^{2+}$ を用いた細胞外カルシウムの流入量の測定を行った。内皮を除去し Fura PE3 を負荷したラット大動脈輪状標本をリアノジン ($20\ \mu\text{M}$) で処置、ベラパミル ($10\ \mu\text{M}$) 存在下、フェニレフリン ($0.3\ \mu\text{M}$) で収縮させ、イソフルラン (1.2–3.5%) を投与、細胞内カルシウム濃度と張力の変化を検討した。その結果、張力、細胞内遊離カルシウム濃度とも、イソフルラン2.3%および3.5%で有意に増加した。また、内皮除去ラット大動脈条片を ^{45}Ca ($1\ \mu\text{M}$)、ニフェジピン ($10\ \mu\text{M}$) を含む HEPES 緩衝液に浸漬し、フェニレフリン ($0.3\ \mu\text{M}$)、イソフルラン (1.2–3.5%) を投与して細胞外からのカルシウム取り込みを測定すると、カルシウム取り込み量はイソフルラン1.2%および2.3%でイソフルラン非投与群に比し有意に増加した。これらの結果から、イソフルランが受容体作動性カルシウムチャネル (ROC) を介した細胞外カルシウム流入を増加させることが示唆された。

はじめに

ハロタンおよびエンフルランは、細胞膜の電位依存性カルシウムチャネル (VOC) 遮断作用、平滑筋細胞内収縮機構のカルシウム感受性の低下

作用などのほか、筋小胞体のカルシウム貯蔵部位からのカルシウム遊離を促進する作用を有しており^{1,2)}、その結果、条件により血管平滑筋の張力を減少または増加させると考えられている。一方、イソフルランも強い VOC 遮断作用を有している^{3–5)}が、筋小胞体への作用はハロタン、エンフルランに比し著しく弱い⁶⁾。しかし、大量の VOC 遮断薬存在下ではイソフルランも血管平滑筋を収縮させることがラット胸部大動脈の摘出標本を用いた実験で報告された⁷⁾。筆者らは、イソフルランが他のハロゲン化合物と同様に平滑筋張力を増加させる効果を示すならば、その作用は筋小胞体への作用以外の別の機構が関与していると考え、その機構を解明するため本研究を行った。

対象と方法

雄性ウイスターラット (250–350 g) の胸部下行大動脈から6–8本の輪状標本 (長さ2 mm) を得、綿棒の擦過により内皮を除去した。蛍光指示薬 Fura PE3-AM ($10\ \mu\text{M}$)、Cremophor EL (0.02 % vol/vol) を含む25℃クレブスリンゲル液中に4–5時間浸漬した後、95% O_2 、5% CO_2 の混合ガスを通気したクレブスリンゲル液を満たし、37℃に維持した組織槽内に1gの静止張力下に固定し、蛍光強度と等尺性張力を連続測定した。蛍光強度は細胞内イオン測定装置 CAF-110 (日本分光) で340 nmと380 nmの励起光を標本に照射したときに発生する蛍光を540 nmで検出し、それらの蛍光強度比 (F_{340}/F_{380}) を細胞内カルシウム濃度の相対的指標として用いた⁶⁾。なお、内皮除去の有効性は、フェニレフリン ($0.1\ \mu\text{M}$) 収縮下

*京都大学医学部麻酔学教室

アセチルコリン (10 μ M) が弛緩作用を示さないことにより確認した⁸⁾。ベラパミル (10 μ M) で10分間前処置した後フェニレフリン0.3 μ Mで血管を収縮させ、張力が安定した後、イソフルラン1.2%, 2.3%, または3.5%を15分間通気 (対照群は無処置と) した。一部の標本は、リアノジン (20 μ M), カフェイン (25 mM) を投与した後標本を洗浄、細胞内貯蔵カルシウムを枯渇させた条件下でベラパミルを投与、同様の検討を行った。

⁴⁵Caを用いた総カルシウム流入量測定には、ラット胸部下降大動脈から4本の条片 (4 \times 8mm)を得、同様に内皮を除去、空気を通気した37 $^{\circ}$ C HEPES緩衝液に浸漬した。フェニレフリン投与後5分以内という比較的短時間の暴露が細胞外からのカルシウム流入を示し、細胞外への再流出の影響を最小限にする⁹⁾ため、ニフェジピン10 μ Mを含むHEPES緩衝液に30分間浸漬した標本を、あらかじめ⁴⁵Ca (1 μ Ci/ml), ニフェジピン (10 μ M), フェニレフリン (0.3 μ M) を添加し、15分間イソフルラン (0-3.5%) を通気したHEPES緩衝液に5分間浸漬した。標本をEGTA 2 mMを含む4 $^{\circ}$ C Ca²⁺ free-HEPES緩衝液で50分間洗浄、5 mM EDTA液中で保管した後、シンチレーション溶液 (Scintisol EX-H) 3 mlを添加、液体シン

チレーションカウンターで標本内に取り込まれた⁴⁵Caの量を計測した。

クレブスリンゲル液の組成は、NaCl 127.5, NaHCO₃ 15.5, glucose 10.0, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, CaCl₂ 2.5 (mM) で、5% CO₂を含む混合ガス通気時のpHは7.35-7.45であった。HEPES緩衝液の組成は、NaCl 140, KCl 5.0, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1.0, dextrose 5.5, HEPES 5.0 (mM) に、NaOHを適宜滴下しpHを7.3に調整した。イソフルランは通気ガスを気化器を通すことにより添加、ガス中のイソフルラン濃度は麻酔ガスモニター (麻酔モニタ303, Atom) で監視した。ガスクロマトグラフィー (5890A Gas chromatograph, Hewlett Packard) を用いた予備実験の結果、リンゲル液およびHEPES液中のイソフルラン濃度は5-7分で安定した。このため、⁴⁵Caを用いた実験でのイソフルラン投与は、イソフルランをHEPES液に使用15分前から通気し液交換後も通気を継続することにより行った。

用いた薬品は、イソフルラン (ダイナボット), Fura PE3-AM (同仁化学), Chremophor EL, ニフェジピン (Sigma), ベラパミル, カフェイン (ナカライテスク), リアノジン (和光純薬) であった。

統計はANOVA, Fisher's PLSDを用い、P<0.05

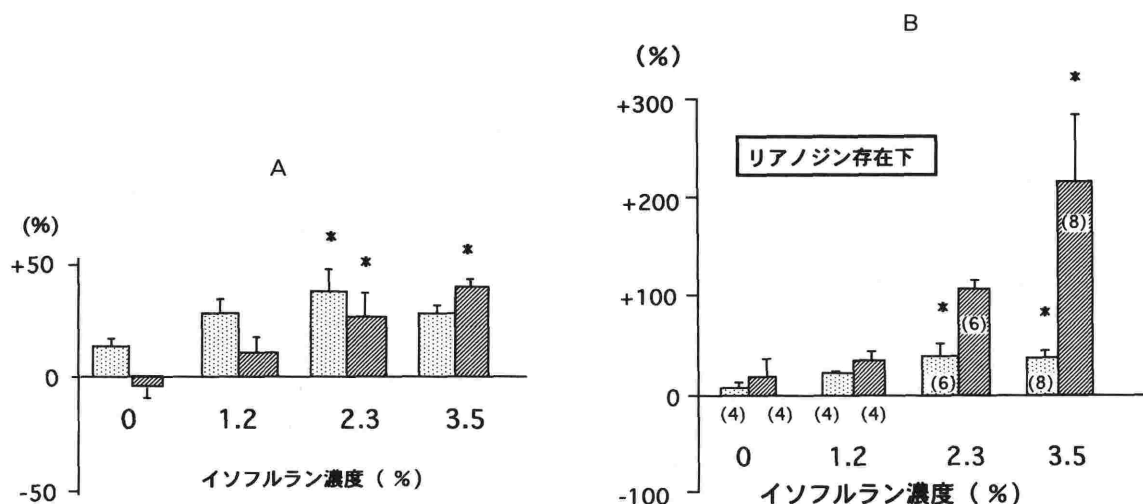


図1 ベラパミル (10 μ M) 存在下フェニレフリン (0.3 μ M) で収縮させた血管の張力と細胞内遊離カルシウム濃度に及ぼすイソフルランの影響。+は増加、-は減少を示し、イソフルラン投与前のフェニレフリンによる収縮高および細胞内遊離カルシウム濃度の増加をそれぞれ100%とした相対値で示す。

□=張力, ▨=[Ca²⁺]_i, *p<0.05 vs. イソフルラン非投与前群 (0%)。A: ベラパミル (10 μ M) 前処置後 (N=10, each), B: ベラパミル (10 μ M) リアノジン (20 μ M) 前処置後。

を有意とした。Data は平均±標準誤差で示した。

結 果

ベラパミル存在下では、フェニレフリン収縮標本は、イソフルラン投与により、細胞内カルシウム濃度の増加を伴い持続性に収縮した (図 1 A)。リアノジン処置標本でも、ベラパミル存在下、イソフルランにより細胞内カルシウム濃度と張力が持続性に増加したが、細胞内カルシウムの増加が張力の増加に比し著しく大きかった (図 1 B, 図 2)。⁴⁵Ca を用いて測定したカルシウム総取り込み量は、フェニレフリン非投与下ではイソフルランにより有意に変化しなかった。フェニレフリン投与による細胞外カルシウムの流入は、イソフルラン 1.2%, 2.3% でイソフルラン非存在下より有意に大となった。(表 1)

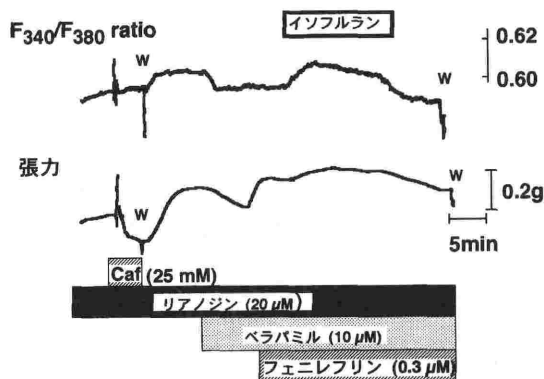


図 2 リアノジン (20 μ M) 処置標本の張力・ F_{340}/F_{380} 比の変化の一例。W=洗浄 Caf=カフェイン

考 察

イソフルランは VOC 遮断効果を有しているため、通常の条件下では血管平滑筋に対し弛緩作用を示す³⁻⁵⁾。フェニレフリンのような α -アゴニストは、ニフェジピン・ベラパミルのような

VOC 遮断薬の大量存在下でも血管を収縮させる¹⁰⁾が、このような条件下でイソフルランを投与すると、VOC はすでに遮断されているため、VOC 遮断効果以外のイソフルランの効果をみる事ができる。本実験はこのような手法により、大量の VOC 遮断薬存在下では、イソフルランが血管平滑筋を収縮させる、あるいはフェニレフリンの効果を増強する作用を有することを明らかにした。

イソフルランは内皮依存性弛緩反応を抑制することが知られている¹¹⁾。したがって、イソフルランがフェニレフリン刺激による内皮依存性弛緩因子即ち一酸化窒素の生成を抑制することにより血管を収縮させる可能性もある。しかし、本実験は内皮除去標本を用いており、したがってここで観察された収縮反応はこのような内皮依存性の作用ではない。また、内皮依存性収縮因子が関与したものの¹²⁾でもない。

ハロタン、エンフルランは、筋小胞体のリアノジン受容体に作用し、細胞内貯蔵カルシウムの遊離を促進することが知られている^{1,2)}。しかし、イソフルランのこの作用はハロタンやエンフルランに比し弱く^{6,13)}、イソフルランの持続的収縮作用を説明しがたいと考えられた。さらに本研究では、VOC 遮断に加え、リアノジン処置によりリアノジン感受性の細胞内カルシウム貯蔵部位の影響を除外した条件下でも実験をおこなったが、この条件下でも、イソフルランは細胞内遊離カルシウム濃度を増加させた。即ち、イソフルランの収縮作用がリアノジン感受性細胞内カルシウム貯蔵部位への作用ではないことが明白に示された。ただし、リアノジン処置はイノシトール 3 リン酸 (IP₃) 感受性のカルシウム貯蔵部位は完全には枯渇させないため、イソフルランが IP₃ を介したカルシウム遊離を増強させる可能性は否定できない。

ニフェジピン存在下で ⁴⁵Ca を用いた実験から、

表 1 カルシウム取り込み (μ Ci/kg)

イソフルラン	0%	1.2%	2.3%	3.5%
非刺激下	53.38±8.796	55.06±8.470	59.42±7.708	52.36±1.50
フェニレフリン刺激下	65.81±9.697	77.08±12.32*	78.80±12.44*	74.26±13.31

* P < 0.05 vs. without isoflurane. N=15, each.

イソフルランはフェニレフリン非存在下のカルシウムとりこみは変化させないが、フェニレフリンによる細胞外からのカルシウム流入を増加させることが示された。フェニレフリンは、VOC、受容体作働性チャネル(ROC)両者からの細胞外カルシウム流入を増加させ、IP₃を介して細胞内貯蔵部位からのカルシウム遊離を促し、さらに、細胞内収縮機構のカルシウム感受性を増加させる。イソフルランがVOC遮断下でフェニレフリンによる細胞外カルシウムのとりこみを増加させたことは、イソフルランがカルシウム拮抗薬抵抗性の、即ちVOC以外のチャネルからのカルシウム流入を増加させたことを示している。このようなチャネルとして、細胞内貯蔵カルシウム遊離による細胞外からのカルシウム流入即ちCapacitative calcium entry^{14,15)}も考えられる。しかし、リアノジン処置標本でも著明な遊離カルシウム増加がみられたことから、むしろ、イソフルランがフェニレフリンによるROCの活性化を増強することが強く示唆された。

文 献

- 1) Su JY, Zhang CC : Intracellular mechanisms of halothane's effect on isolated aortic strips of the rabbit. *Anesthesiology* 71 : 409-417, 1989
- 2) Su JY, Chang YI, Tang LJ : Mechanisms of action of enflurane on vascular smooth muscle. Comparison of rabbit aorta and femoral artery. *Anesthesiology* 81 : 700-709, 1994
- 3) Buljubasic N, Flynn NM, Marijic J, et al : Effects of isoflurane on K⁺ and Ca²⁺ conductance in isolated smooth muscle cells of canine cerebral arteries. *Anesth Analg* 75 : 590-596, 1992

- 4) Buljubasic N, Rusch NJ, Marijic J, et al : Effects of halothane and isoflurane on calcium and potassium channel currents in canine coronary arterial cells. 76 : 990-998, 1992
- 5) Wilde DW : Isoflurane reduces Ca⁺⁺ channel current and accelerates current decay in guinea pig portal vein smooth muscle cells. *J Pharm Exp Ther* 271 : 1159-1166, 1994
- 6) Kakuyama M, Hatano Y, Nakamura K, et al : Halothane and enflurane constrict canine mesenteric arteries by releasing Ca²⁺ from intracellular Ca²⁺ stores. *Anesthesiology* 78 : 1120-1127, 1994
- 7) Namba H, Tsuchida H : Effect of volatile anesthetics with and without verapamil on intracellular activity in vascular smooth muscle. *Anesthesiology* 84 : 1465-1474, 1996
- 8) Furchgott RF, Zawadzki JV : The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376, 1980
- 9) Meisheri KD, Hwang O, van Breemen C : Evidence for two separate Ca²⁺ pathways in smooth muscle plasmalemma. *J Membr Biol* 59 : 19-25, 1981
- 10) Godfraind T : Actions of nifedipine on calcium fluxes and contraction in isolated rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 224 : 443-450, 1983
- 11) Toda H, Nakamura K, Hatano Y, et al : Halothane and isoflurane inhibit endothelium-dependent relaxation elicited by acetylcholine. *Anesth Analg* 75 : 198-203, 1992
- 12) Stones DJ, Johns RA : Endothelium-dependent effects of halothane, enflurane, and isoflurane on isolated rat aortic vascular rings. *Anesthesiology* 71 : 126-132, 1989
- 13) Tsuchida H, Namba H, Seki S, et al : Role of intracellular Ca²⁺ pools in the effects of halothane and isoflurane on vascular smooth muscle contraction. *Anesth Analg* 78 : 1067-1076, 1994
- 14) Byron K, Taylor CW : Vasopressin stimulation of Ca²⁺ mobilization, two bivalent cation entry pathways and Ca²⁺ efflux in A7r5 rat smooth muscle. *J Physiol Lond* 485 (Pt 2) : 455-468, 1995
- 15) Wayman CP, Gibson A, McFadzean I : Depletion of either ryanodine- or IP₃-sensitive calcium stores activates capacitative calcium entry in mouse anococcygeus smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 435 : 231-239, 1997

Isoflurane Increases Calcium Influx from Channels Resistant to Calcium Antagonists

Rie Kitamura*, Taijiro Enoki*, Shinichi Hirata*, Kumi Nakamura*, Masahiro Kakuyama*, Kenjiro Mori*

*Department of Anesthesia, Kyoto University Hospital
Kyoto, Japan

This study attempted to clarify the mechanism of isoflurane-induced contraction of vascular smooth muscle (VSM) by measuring the intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in and $^{45}Ca^{2+}$ uptake by rat aortic VSM in the presence of a supramaximal dose of one of the L-type calcium channel blockers, verapamil and nifedipine. Endothelium-denuded rat aortic rings were loaded with the calcium-sensitive fluorescent dye, fura PE3, in order to measure F340/F380 as an indicator of $[Ca^{2+}]_i$. Isoflurane (2.3%

and 3.5%) increased the tension and $[Ca^{2+}]_i$ of phenylephrine ($0.3 \mu M$)-contracted aortae in the presence of verapamil ($10 \mu M$) even after treatment with ryanodine ($20 \mu M$). Isoflurane (1.2% and 2.3%) enhanced the phenylephrine-induced uptake of $^{45}Ca^{2+}$ by endothelium-denuded aortic strips in the presence of nifedipine ($10 \mu M$).

These results indicate that isoflurane enhances phenylephrine-induced Ca^{2+} influx through channels resistant to L-type channel blockers.

Key words : Isoflurane, Calcium channel, Muscle vascular, Contraction, Ions calcium

(Circ Cont 19 : 20~24, 1998)