原著

イヌ脳底動脈における phorbol ester の収縮機序について —Fura-2 を用いての細胞内 Ca^{2+} 濃度, 張力の同時測定 (第1報)—

田 中 裕 一 山 田 武 藤 本 清 成
中 原 昇 斉 藤 充 増 沢 紀 男

Analysis of the Mechanism of Contraction Induced by Phorbol Ester in Canine Basilar Artery : Simultaneous Recording of Tension and Cytosolic Ca^{2+} Concentration in Using Fura-2 (1st report)

by

Yuichi Tanaka M.D., Takeshi Yamada M.D., Kiyoshige Fuzimoto M.D., Noboru Nakahara M.D.,
Mitsuru Saito M.D., and Toshio Masuzawa M.D.

from

Department of Surgical Neurology, Jichi Medical School

The effect of phorbol ester, 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate (DPB), on the contraction of isolated vascular smooth muscle in canine basilar artery was examined. The muscle tension and cytosolic Ca^{2+} level ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) were recorded simultaneously using fura-2. Ca^{2+} -free solution was made by removing Ca^{2+} and adding 0.5 mM EGTA to physiological salt solution (PSS). Contraction was induced by high K^+ (72.4 mM) and DPB (10^{-6}M). High K^+ induced sustained contraction with a sustained increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in PSS. DPB induced sustained contraction, although it induced only a transient increase followed by a decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ below the resting level. The tension induced by DPB was greater than that induced by high K^+ . Diltiazem inhibited the transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. In Ca^{2+} -free solution, high K^+ did not induce contraction, suggesting that high- K^+ -induced contraction was dependent on the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. DPB induced transient contraction, the maximum tension of which was similar to that in the presence of Ca^{2+} . In Ca^{2+} -free solution, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ decreased below the resting level and DPB did not change $[\text{Ca}^{2+}]_i$, suggesting that the transient contraction was not due to the release of Ca^{2+} from cellular stores. The transient increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induced by DPB was inhibited by diltiazem and disappeared in Ca^{2+} -free solution, suggesting that it was due to the influx of extracellular Ca^{2+} through a voltage-dependent Ca^{2+} channel.

Conclusions : DPB induced sustained contraction in the presence of external Ca^{2+} and transient contraction in Ca^{2+} -free solution. These results suggested that DPB increases the sensitivity of contractile elements to Ca^{2+} , and small amount of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is necessary for the sustained contraction induced by DPB.

(Received November 18, 1993 ; accepted March 22, 1994)

Key words : fura-2, 12 deoxy-phorbol 13-isobutyrate (DPB), Ca^{2+} sensitivity, protein kinase C, canine basilar artery

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 3 : 411-416, 1994

はじめに

最近 Ca 蛍光指示薬 fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 張力が同時測定できるようになり, 従来考え

られていたような細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存した収縮機序だけでなく, 細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存の少ない収縮機序の存在が明らかになり, その機序として Ca 感受性の増加が考えられてきている. この Ca 感受性の増加の機序

自治医科大学脳神経外科 / 〒 329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 331-1 (連絡先: 田中裕一)

Address reprint requests to : Yuichi Tanaka, M.D., Department of Surgical Neurology, Jichi Medical School, 331-1 Yakushiji, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun 329-04, Tochigi, Japan

の一つに protein kinase C (PKC) の関与が考えられているが、最近、脳血管攣縮の発生に PKC の関与を示唆する報告がいくつかみられるようになった。今回われわれは、この PKC activator である phorbol ester の一つである 12-deoxy-phorbol 13-isobutyrate (DPB) のイヌ脳底動脈における収縮機序について、fura-2 を用いて実験的検討を行ったので報告する。

対象および方法

雑種成犬 (10~15 kg) を sodium pentobarbital による全身麻酔下に脱血屠殺した後、脳底動脈を摘出し、ラセン標本 (1.5×6 mm) を作成した。内皮は正常栄養液に浸した濾紙で、血管内腔面を軽く擦ることにより除去した。次に、Ca 蛍光指示薬 fura-2 の負荷は、5 μ M fura-2/AM と界面活性剤の cremophol (0.02%) を含んだ栄養液に血管片を入れ、95%O₂+5%CO₂ の混合ガスを通気しながら、室温下に 3~4 時間浸すことにより行った。張力測定は、37°C に保った水平型恒温槽に血管片の一端をピンで固定し、他方を張力トランスデューサーに接続し、至適静止張力を 1.0 g として行った。また、[Ca²⁺]_i の測定は、専用の測定機器である日本分光 CAF-100 を用いた。[Ca²⁺]_i は、絶対値ではなく、2 波長励起光 (340 nm, 380 nm) に対する蛍光比 (R340/380) で相対値として表した。これらの測定は Sato らの方法¹⁷⁾に従って行った。

実験は、血管条片に fura-2 を負荷した後、次の条件下で DPB (10⁻⁶M) を投与し、張力、[Ca²⁺]_i を同時測定した。

① 正常栄養液中での反応

② Ca antagonist である diltiazem (10⁻⁶M) を前投与した時の反応

③ Ca 除去液 (+0.5 mM EGTA) 中での反応

また、同時に正常栄養液中および Ca 除去液中での高濃度 K⁺ 溶液投与による張力および [Ca²⁺]_i の変化も測定した。

正常栄養液の組成は、NaCl 136.9 (mM), KCl 5.4, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1.0, glucose 5.5, NaHCO₃ 23.8, EDTA 0.01 であり、95%O₂+5%CO₂ で飽和させ、pH7.4 (37°C) とした。高濃度 K⁺ 溶液は、正常栄養液の NaCl を等濃度の KCl に置換したものをを用いた。Ca 除去後は、正常栄養液から CaCl₂ を除き、代わりに 0.5 mM EGTA を加えて作成した。

使用した薬剤は、fura-2/AM (同仁化学), cremophor EL (SIGMA), 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate

Fig. 1 High K⁺-induced contraction in physiological salt solution and Ca²⁺-free solution

High K⁺ induced sustained contraction with a sustained increase in cytosolic Ca²⁺ level ([Ca²⁺]_i). In Ca²⁺-free solution, high-K⁺ did not induce contraction and did not change [Ca²⁺]_i.

(DPB, LC Services Corp), diltiazem hydrochloride (和光純薬), ethyleneglycol bis (2-aminoethyl ether) tetraacetic acid (EGTA) である。

結果

正常栄養液中では高濃度 K⁺ は大きな持続性の張力を発生させ、同時に [Ca²⁺]_i も持続性に増加させたが、Ca 除去液中では、張力はまったく発生させず、[Ca²⁺]_i も増加させなかった (Fig. 1)。一方、DPB は正常栄養液中で高濃度 K⁺ より大きな張力を発生させた。[Ca²⁺]_i は、初期にわずかに増加した後、逆に静止レベルより徐々に減少し、洗浄により張力、[Ca²⁺]_i はともに静止レベルに戻った (Fig. 2)。diltiazem を前投与した場合は、DPB 投与による収縮の立ち上がりは緩くなったが、発生張力の大きさはほとんど変わらなかった。この時、[Ca²⁺]_i は静止レベルより低下したまま変化はみられなかった (Fig. 2)。Ca 除去液中では、DPB による収縮は、初期の張力の急な立ち上がりが見られずゆっくりとした張力発生を示し、この収縮は diltiazem 前投与の時と類似していた。この時、[Ca²⁺]_i は静止レベルより低下したまま変化はみられなかった (Fig. 3)。

次に、DPB 収縮の持続について、正常栄養液および Ca 除去液中で調べた。正常栄養液中では DPB 収縮は持続性に増加し、あるいは一定の張力を長く持続した (Fig. 4A)。一方、Ca 除去液中では DPB は収縮を発生させるが、その収縮は長く持続せず、徐々に減少し静止レベルに戻った (Fig. 4B)。

Fig. 2 DPB-induced contraction in physiological salt solution

DPB induced phasic contraction in the initial phase and then induced sustained contraction, although it induced only a transient increase followed by a decrease in $[Ca^{2+}]_i$ below the resting level. The tension induced by DPB was greater than that induced by high K^+ . Diltiazem inhibited both the transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ and the phasic contraction induced by DPB. As a result of this, the tension induced by DPB increased gradually.

Fig. 3 DPB-induced contraction in physiological salt solution and Ca^{2+} -free solution

DPB induced phasic contraction in the initial phase and then it induced sustained contraction. In Ca^{2+} -free solution, DPB induced transient contraction, the tension of which increased gradually, but phasic contraction was not observed. The maximum tension of DPB-induced contraction was similar to that in the presence of Ca^{2+} . The cytosolic Ca^{2+} level was decreased below the resting level and did not change during contraction.

Fig. 4 DPB-induced contraction in PSS (A) and Ca^{2+} -free solution (B)

DPB induced sustained contraction, the tension of which increased gradually or remained at the maximum level in PSS. In Ca^{2+} -free solution, DPB induced transient contraction, the maximum tension of which was similar to that in the presence of Ca^{2+} . The cytosolic Ca^{2+} level decreased below the resting level and did not change during contraction.

考 察

平滑筋の細胞内 Ca 量測定法としては、原子吸光光度計などを用いて組織の総 Ca 量を測定するもの、放射性 Ca を用いて交換可能分画の Ca を測定するものなどが

あるが、いずれを用いても細胞内遊離 Ca と結合 Ca を分離して測定することは困難である⁴⁾¹³⁾。近年、 Ca 蛍光指示薬 fura-2 が R. Y. Tsien らにより開発され、細胞内遊離 Ca 濃度が測定されるようになった¹³⁾。fura-2 は 360 nm に最大励起波長をもち、500 nm の蛍光を出し、

Fig. 5 Schema of DPB-induced contraction

DPB induced phasic contraction in the initial phase in PSS (dotted line). This phasic contraction was inhibited by diltiazem or Ca^{2+} -free solution (solid line).

Ca が結合すると最大励起波長は 340 nm に向かって変化するため、340 nm 励起蛍光 (F340) は増加し、380 nm 励起光 (F380) は減少し、蛍光比 F340/380 は増加するが、360 nm 励起光は不変点として一定値にとどまる。このような蛍光量の変化から Ca 濃度が計算できる¹⁸⁾。Ca 蛍光を測定する上でいくつかの誤差要因があるが、そのうち fura-2 の漏出による誤差は蛍光比 F340/F380 を計算することにより補正されるため、今回の実験ではこの蛍光比を用いた¹⁸⁾。また、今回のような血管平滑筋の Ca 量の測定を行ううえで、平滑筋細胞の fura-2-Ca 蛍光に対する内皮細胞の fura-2-Ca 蛍光を考慮しなくてはならない。内皮細胞は、各種血管作動薬により血管弛緩物質 (EDRF) を放出するが、この時内皮細胞内の Ca 濃度が増加し蛍光を発するため、平滑筋細胞の反応を観察する場合は内皮を除去することが必要であり¹⁸⁾、今回の実験では内皮を除去した血管条片を用いた。唐木らにより、この fura-2 を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と張力の同時測定が行われるようになり、平滑筋の収縮と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ との関係が従来考えられてきたようなものではないことが明らかになってきた⁷⁾¹⁴⁾。唐木らは、ラット大動脈を用いた実験で、発生張力と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の関係が収縮物質により差があり、receptor agonist による収縮では、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が静止レベルであっても張力が発生していることより、その機序として収縮蛋白系の Ca 感受性の増加を考察している^{2)~9)}。われわれは、イヌ脳底動脈を用いた実験で同様の結果を得て、収縮物質により Ca 感受性が変化することを報告してきた²¹⁾²²⁾。現在、この Ca 感受性の増加の機序に、PKC が関与していると考えられているが⁹⁾、最近、この PKC が血管攣縮の発生に関係しているという報告が散見されるようになってきた¹⁾¹⁰⁾¹²⁾。今回、われわれはこの PKC activator である phorbol ester の一つである DPB のイヌ脳底動脈における収縮機序について、fura-2 を用いて実験的検討を加えた。Sakata ら¹⁶⁾は、ラット大動脈では低濃度 (10^{-7}M 以下) の DPB は内皮

存在下で弛緩作用を示し、高濃度 (10^{-7}M 以上) では収縮作用を示すと報告しているが、今回の実験では高濃度 (10^{-6}M) の DPB を用いた。

高濃度 K^+ は、正常栄養液中では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を伴った収縮を発生させるが、Ca 除去液中ではまったく張力を発生させず、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止レベル以下に下がったまま変化はみられなかった。このことから、高濃度 K^+ による収縮は細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加に依存した収縮と考えられる。これに対し、DPB は正常栄養液では高濃度 K^+ 収縮より大きな持続性の張力を発生させるが、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は収縮初期にわずかに増加した後、逆に静止レベルより徐々に減少した。この収縮初期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、Ca 除去液中および diltiazem 前投与により消失することから、L 型 Ca-channel を介した細胞外 Ca^{2+} の流入によるものと考えられる。また、この初期の収縮は、図に点線で示すように張力の立ち上がりが急で phasic な形をしており、Ca 除去液中および diltiazem 前投与により消失し、実線で示すような収縮となった。このことから、点線で示した部分の収縮が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加に依存した部分の収縮と考えられる (Fig. 4)。

この DPB 収縮の初期の部分は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を伴う収縮であるが、K 収縮に比べその $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は少ないにもかかわらず、K 収縮より大きな張力を発生させている。また、初期以降の部分の収縮は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は逆に静止レベル以下に減少しているが、K 収縮より大きな張力を発生させていることから、DPB 収縮の機序の一つに Ca 感受性の増加が考えられる。

平滑筋の Ca 感受性の増加の機序について、最近の研究では²⁾⁹⁾¹⁹⁾、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ とミオシンのリン酸化の関係が各収縮物質により異なり、norepinephrine, prostaglandin, endothelin, phorbol ester の順に大きくなるが、ミオシンのリン酸化と収縮の関係は変わらないことから、これらの収縮物質がミオシンのリン酸化の Ca 感受性を増加させていると考えられている⁹⁾。したがって、平滑筋の Ca 感受性の増加の一部はこのミオシンリン酸化の Ca 感受性の変化で説明できる。また、受容体作動薬や DPB は Ca 除去液中で収縮を起こすが、ミオシン軽鎖のリン酸化を伴わなかった²⁾¹⁹⁾。このことから、ミオシンのリン酸化に依存しない収縮機構の存在が示唆されるが、その機構については明らかにはなっていない⁹⁾。この EGTA 存在下でみられる収縮は Ca 濃度をさらに下げると消失することから、微量の Ca に依存し、Ca 感受性の増加により収縮を起こすということが、スキンドファイバーを用いた実験で明らかになった²⁾⁹⁾。phorbol ester も受容体作動薬と同様に、ミオシンリン酸化を伴わない収縮

を示すことから, phorbol ester の収縮機構として $[Ca^{2+}]_i$ の増加に続くミオシンリン酸化, ミオシンリン酸化の Ca 感受性の増加, およびミオシンリン酸化を伴わない収縮の3つの機構が考えられる¹⁶⁾. DPB などの phorbol ester は直接 PKC を活性化して収縮を起こすと考えられているが, この機序の詳細は不明である¹⁵⁾¹⁹⁾. 受容体作動薬は diacylglycerol の産生を介して C kinase を活性化するが, phorbol ester の作用機序が受容体作動薬と同一かどうかは明らかでない⁷⁾⁹⁾. rat aorta で DPB を24時間作用させ, PKC のダウンレギュレーションを行った実験では, 受容体作動薬は張力を発生させるが, DPB は張力を発生させなかった. この結果から, 受容体作動薬と phorbol ester の収縮機序は異なることが考えられる²⁰⁾.

以上のことから, 平滑筋の Ca 感受性の増加する機構として, 受容体, Gタンパクを介する機構と PKC を介する機構の存在が考えられている⁹⁾. 一般に, 血管平滑筋が収縮する場合は, $[Ca^{2+}]_i$ が増加し, 張力が発生する. しかし, 今回の実験では DPB 収縮時には $[Ca^{2+}]_i$ は予想に反して減少した. この DPB 収縮と $[Ca^{2+}]_i$ の関係については増加するという報告¹⁵⁾や, 減少するという報告¹¹⁾もあり, 一定していない. DPB 収縮時に $[Ca^{2+}]_i$ が静止レベル以下に減少する機序については明らかではないが, 森ら¹¹⁾は細胞内貯蔵部位への Ca の取り込みが促進されたため, あるいは Ca の細胞外へのくみ出しが促進されたためではないかと考察している. いずれにしろ, これらの成績は DPB 収縮が $[Ca^{2+}]_i$ の増加を必要としないことを示している¹⁵⁾. しかし, DPB は Ca 存在下では持続性収縮を起こすのに比べて, Ca 除去液中では一過性の収縮しか起こさなかった (Fig. 5A, B). 0.5 mM EGTA を含んだ Ca 除去液中の Ca 濃度はほぼ 10^{-8} M と考えられ, このような溶液中では細胞内 Ca は徐々に減少する²³⁾. したがって DPB 収縮が一過性となるのは, DPB 収縮には微量の Ca^{2+} が必要であり, 細胞内 Ca^{2+} がそれより減少すると収縮が低下するものと考えられる.

まとめ

イヌ脳底動脈における DPB の収縮機序について, 実験的検討を行った. DPB 収縮の初期は $[Ca^{2+}]_i$ が少量増加するが, これは L 型 Ca-channel を介した細胞外 Ca^{2+} の流入によるものであると考えられる. 収縮の初期以降は $[Ca^{2+}]_i$ は静止レベル以下に減少するにもかかわらず, K収縮より大きな張力を発生させることから,

DPB の収縮機構の中に Ca 感受性の増加が考えられた. また, DPB は Ca 除去液中でも張力を発生させるが, その張力は長くは持続しないことから, DPB 収縮の持続には微量の Ca^{2+} の存在が必要であると考えられる.

この論文の要旨は, 第13回日本脳神経外科コンgres総会(1993年5月, 福島)で発表した.

稿を終えるにあたり, この研究に終始多くのご指導をいただいた東京大学農学部獣医薬理学教室唐木英明教授, 佐藤晃一, 堀正敏先生に深謝いたします. また, 同時にこの研究を行ううえで多大なご協力をいただいた脳神経外科教室諸先生, 当研究室の川名子, 鴨下, 小峰氏, 自治医大動物実験センター 佐藤氏に深謝いたします.

文 献

- 1) 浅野孝雄, 松居 徹, 多久和陽: 脳血管攣縮と Protein kinase C 依存性収縮機構. 脳外 19: 207-219, 1991.
- 2) Hori M, Sato K, Sakata K, Ozaki H, Takano-Ohmuro H, Tsuchiya T, Sugi H, Kato I, Karaki H: Receptor agonists induce myosin phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent contractions in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 506-512, 1992.
- 3) Karaki H, Sato K, Ozaki H, Murakami K: Effect of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 156: 259-266, 1988.
- 4) 唐木英明: ^{45}Ca トレーサー法. 生体の科学 39: 443-445, 1988.
- 5) Karaki H, Ozaki H: Relationship between cytosolic calcium level and contractile tension in vascular smooth muscle, in Aoki K (ed): *Essential Hypertension 2*. Tokyo, Springer Verlag, 1989, pp. 95-110.
- 6) Karaki H: Cytosolic calcium levels in vascular smooth muscle. *Acta Haematol Jpn* 52: 1506-1515, 1989.
- 7) 唐木英明: 平滑筋のカルシウムによる制御機構. 日薬理誌 96: 289-299, 1990.
- 8) Karaki H, Sato K, Ozaki H: Different effects of verapamil on cytosolic Ca^{2+} and contraction in norepinephrine-stimulated vascular smooth muscle. *Jpn J Pharmacol* 55: 35-42, 1991.
- 9) 唐木英明: ミオシンの磷酸化機構と平滑筋の Ca^{2+} 感受性の変化. 生体の化学 44: 198-205, 1993.
- 10) 松居 徹, 多久和陽, 浅野孝雄: 脳血管攣縮におけるプロテインカイネース C (PKC) の役割. 血管 14: 253-260, 1991.
- 11) 森 豊樹, 柳澤輝行, 平 則夫: ホルボールエステルの血管収縮作用と細胞内カルシウムレベルの変化. 血管 14: 85-92, 1991.
- 12) Nishizawa S, Nezu N, Uemura K: Direct evidence for a key role of protein kinase C in the development of vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 76: 635-639, 1992.
- 13) 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: 652-654, 1989.
- 14) Ozaki H, Kwon SC, Tajimi M: Changes in cytosolic Ca^{2+} and contraction induced by various stimulants and relaxants in canine tracheal smooth muscle. *Pflugers Arch* 416: 351-359, 1990.

- 15) Ozaki H, Ohyama T, Sato K, Karaki H : Ca^{2+} -dependent and independent mechanism of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. *Jpn J Pharmacol* **52** : 509-512, 1990.
- 16) Sakata K, Karaki H : Phorbol ester-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Eur J Pharmacol* **179** : 207-210, 1990.
- 17) Sato K, Ozaki H, Karaki H : Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strip measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. *J Pharmacol Exp Ther* **246** : 294-300, 1988.
- 18) 佐藤晃一, 尾崎 博, 長瀬裕美, 唐木英明 : 細胞内 Ca 測定法(蛍光指示薬). カルシウムと情報伝達系, 東京, 文永堂出版, 1991, pp. 161-196.
- 19) Sato K, Hori M, Ozaki H, Takano-Ohmuro H, Tsuchiya T, Sugi H, Karaki H : Myosin phosphorylation-independent contraction induced by phorbol ester in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **261** : 497-505, 1992.
- 20) Sato K, Karaki H : Activation of protein kinase C is involved in the vascular contraction induced by receptor agonists. *Jpn J Pharmacol* **58** (Suppl 2) : 414, 1992.
- 21) 田中裕一, 山田 武, 藤本清成, 中原 昇, 斉藤 充, 増沢紀男 : イヌ脳底動脈平滑筋の各種血管収縮物質による収縮および弛緩時における細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力変化の同時測定. 脳血管攣縮 8, 東京, 中外医学社, 1993, pp. 169-174.
- 22) 山田 武, 田中裕一, 藤本清成, 中原 昇, 永井 陸, 増沢紀男 : イヌ脳底動脈平滑筋における細胞内 Ca^{2+} 量と収縮の同時測定. 脳外誌 **1** : 151-156, 1992.
- 23) Wheeler ES, Weiss GB : Correlation between response to norepinephrine and removal of ^{45}Ca from high-affinity binding sites by extracellular EDTA in rabbit aortic smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* **211** : 353-359, 1979.

要 旨

イヌ脳底動脈における phorbol ester の収縮機序について —Fura-2 を用いての細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力の同時測定 (第1報)—

田中 裕一 山田 武 藤本 清成 中原 昇
斉藤 充 増沢 紀男

最近, 脳血管攣縮の発生に protein kinase C (PKC) の関与が考えられているが, 今回われわれはこの PKC activator である phorbol ester の 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate (DPB) を用いて, イヌ脳底動脈での張力と細胞内 Ca 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を fura-2 を用いて同時測定し, 作用機序について検討した. DPB 収縮初期の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は, diltiazem 前投与および Ca 除去液中で抑制され, 細胞外 Ca^{2+} の流入によるものと思われる. また, 静止レベル以下の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ で張力を発生させることから, 収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性の増加が考えられる. また, Ca 除去液中でも張力を発生させるが長く持続しないことから, DPB 収縮の持続には微量の Ca^{2+} が必要と考えられた.

脳外誌 **3** : 411-416, 1994