脳血管攣縮の基礎的研究

—脳血管平滑筋細胞内における Ca^{2+} の局在—

福岡 秀和・高木 卓爾・永井 肇・堀田 健*

Basic Research on Cerebral Vasospasms

—Calcium Localization in Cerebral Vascular Smooth Muscle—

HIDEKAZU FUKUOKA, TAKUJI TAKAGI, HAJIME NAGAI and KEN HOTTA*

Department of Neurosurgery, Nagoya City University, Nagoya 467

**Department of Physiology, Nagoya City University*

Summary

It has been established that the contractile system in cerebral vascular smooth muscle involves myosin and actin, which form thick and thin filaments, respectively and that their activities are regulated by the intracellular free Ca^{2+} concentration. The membrane system, both the cell surface and intracellular organelles, seems to be responsible for controlling the myoplasmic Ca^{2+} level.

An attempt was made to show the localization of intracellular Ca^{2+} , which might play a key role on the regulation of contractile elements in bovine cerebral arteries. The pyroantimonate precipitate method was used. For quantitative chemical analysis of the pyroantimonate precipitates, the sections were analyzed with an energy dispersive X-ray microanalyzer (EDAX 711) attached to a transmission scanning electron microscope; the output of the analyzer was processed by a computer system. A distinct peak at 3,620 eV, which was considered as a combined peak of Sb-L α and Ca-K α lines, was always observed in all the precipitates examined, indicating that the precipitates may serve as a valid measure of Ca^{2+} localization.

When the muscle cells were fixed after 50 minutes of soaking in high-K Krebs solution (127 mM-K substituted for Na) containing 10.8 mM Ca, the precipitates were mostly observed at the plasma membrane, the sarcoplasmic reticulum, the mitochondria and the nuclei. It was not, however, possible to decide whether the precipitates on the plasma membrane were located on its inner surface or its outer surface. In this condition, the muscle cells were completely relaxed during fixation.

If the preparations were fixed without pretreatment, they showed marked tension development in response to the pyroantimonate-osmium solution. The precipitates were mostly distributed randomly in the myoplasm of the muscle cells fixed during mechanical activity, while the precipitates were rarely seen at the plasma membrane, the sarcoplasmic reticulum and the mitochondria.

The results obtained in these experiments are in general agreement with previous reports on different kinds of smooth muscles, strongly suggesting that the Ca^{2+} accumulated at the plasma membrane, the sarcoplasmic reticulum and the mitochondria is released into the myoplasm to cause contraction in bovine cerebral arterial smooth muscle.

Key words: calcium localization, pyroantimonate, vascular smooth muscle, X-ray microanalysis, cerebral vasospasm

名古屋市立大学脳神経外科

* 名古屋市立大学第一生理

[連絡先: 〒467 名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1番地, 名古屋市立大学脳神経外科, 福岡秀和]

1980年9月1日 受稿

I はじめに

脳動脈瘤破裂後、クモ膜下出血による脳血管攣縮は臨床しばしば遭遇するが、その治療は困難で効果的な対策は見い出されていない。脳血管攣縮に対する根本的な治療法を確立するためには、脳血管平滑筋についての基礎的な研究が必要である。

血管平滑筋の細胞内には、 Ca^{2+} の結合部位が存在し、その遊離が収縮蛋白を活性化するという機序は、すでに明らかにされている⁹⁾¹¹⁾¹⁵⁾。しかし賦活作用を有する Ca の起源についてはまだ不明な点が多い。

今回著者らは、脳血管平滑筋細胞内の Ca^{2+} の局在と、脳血管平滑筋の収縮と弛緩時における Ca^{2+} の移動を、pyroantimonate法により形態学的に検討した。Pyroantimonateは細胞内に入り、 Ca^{2+} と結合して電子密度の高い沈澱を作ることが知られている。しかしながらpyroantimonateは Na^+ 、 Mg^{2+} をはじめ他の金属とも沈澱を作るので、観察される顆粒が Ca^{2+} を含んでいるかどうかの同定は、エネルギー分散型X線マイクロアナライザーを用いて行った。

II 実験材料と方法

新鮮なウシ脳底動脈を材料とした。すなわち、ウシの屠殺後、頭蓋内より迅速に脳幹部を脳底動脈が付着したままの状態に取り出し、ついで脳底動脈を脳幹部より剝離して採取した。この動脈片からmodified Krebs溶液中で、顕微鏡下に $2 \times 10\text{mm}$ のラ線状標本を作成した。このラ線状標本を95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスで飽和したmodified Krebs溶液に入れ、small chamber内でこの一端を固定し、他端をストレンゲージ force transducer (FD pick up, SB-IT 日本光電)に接続した。そして resting tension 500 mg で 25°C 、50分間 incubateしてこれを実験材料とした。

Debbas ら³⁾が家兎大動脈の Ca^{2+} の局在と同定に用いた方法にならい、実験群をA, B, Cの3群に分類し、等尺張力の測定を行いながらそれぞれ異なった条件下で固定した (Fig. 1)。

A群: Potassium pyroantimonate— OsO_4 固定液による直接固定

5% $\text{K}_2\text{Sb}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ は以下のごとく作成した。つまり100 ml の脱イオン水に5 g の $\text{K}_2\text{Sb}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ を入れ煮沸する。この溶液を 4°C に冷却後、脱イオン水を加え再び100 ml とし、Whatmann #5 濾紙を用いて濾過した。冷却によって沈澱したpyroantimonateを除外し、これを標準液とした。この標準液の一部に2% OsO_4 を加え

Fig. 1 Steps performed in procedures A, B and C.

て、2% $\text{K}_2\text{Sb}_2\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1% OsO_4 とし、酢酸 (0.01 N) で 4°C 、pH7.8に調整した。使用直前、再びWhatmann #5 濾紙を用いて濾過し、沈澱したpyroantimonateを除外し、再び 4°C でpH7.8に調整した。

この固定液を用いて、small chamber内でラ線状標本を 4°C で90分間固定した。固定終了後、脱水前にアルカリ溶液 (0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.8, 4°C) で5分間2回洗浄した。ついで上昇エタノール系で脱水し、プロピレンオキシドを通し、Epon 812に包埋熱化した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用いて、Poter-Blum ultramicrotome MT II で作製し、1)末染色群、2)酢酸ウラニール・クエン酸鉛による二重染色群の両者を、日立HU-12型電子顕微鏡で観察した。

B群: CaCl_2 を含む脱分極液で incubate 後における固定

B群のラ線状標本は、固定前に脱分極液に50分間 25°C で incubate した。脱分極液の組成は、Tris-HCl 23 mM (pH 7.5), KCl 127 mM, glucose 11 mM, CaCl_2 10.8 mM である。この脱分極液は使用する直前に100%酸素

Fig. 2 Tension development during pyroantimonate-osmium fixation.

で10~15分間飽和し、incubate 中は10分ごとに新しい酸素飽和脱分極液に入れかえた。その後の過程はA群と同様である。

C群: CaCl_2 を含まない脱分極液で incubate 後における固定

C群のラ線状標本は、固定前に Ca^{2+} を含まない脱分極液で25℃50分間 incubate した。その後はA群と同様の過程で処理した。

Pyroantimonate 沈澱顆粒のX線解析

電子顕微鏡上、観察した沈澱顆粒の化学的な同定を行うためA, B両群のブロックを約1000Åの厚さに薄切し、炭素蒸着したフォルムバル支持膜を張った銅メッシュに載せた。エネルギー分散型X線分析器 (EDAX711) を装着し、透過型に切り変えた HH8-2R 型走査電子顕微鏡で観察し、1) A群の形質内に不規則に分散している沈澱顆粒と、2) B群の形質膜に付着している沈澱顆粒につ

Fig. 3 a) Smooth muscle cell fixed by procedure A. Bar represents 2 μm . Abundance of precipitates seen deposited inside the nuclear membrane. Precipitates are also distributed throughout the myoplasmic space. CP: precipitates, M: mitochondria, N: nucleus.

b) Smooth muscle cell fixed by procedure C. Bar represents 2 μm . Far fewer precipitates seen in the cytoplasmic space than in Fig. 3a. No precipitate in mitochondria.

いてX線点分析を行った。加速電圧は20 KV とし、試料電流は 2×10^{-10} A で、400 秒間の点分析を行い、on line の電子計算機で分析結果を処理した。

Ⅱ 実験結果

1. A, B, C の各実験条件下における等尺張力について

Fig. 2 はそれぞれの固定時の等尺張力を示したものである。A群では、脳血管平滑筋は OsO_4 添加により著しい収縮を示したが、B, C群では張力を発生しなかった。

2. A, B, C 各群の電子顕微鏡像

1) A群の電顕像

Fig. 3a は実験A群の電顕像を示した。Pyroantimonate 沈澱顆粒は細胞内に不規則に分散していた。核や核小体には、細胞形質や小器官に比べ豊富な沈澱顆粒が存在した。ミトコンドリアには沈澱顆粒の存在するものから、まったく存在しないものが観察された。形質膜、筋小胞体には、ほとんど沈澱顆粒はみられなかった。

2) C群の電顕像

Na^+ と Ca^{2+} を含まない脱分極液で incubate 後固定した群 (Fig. 3b) では、脱分極液に incubate しないA群 (Fig. 3a) に比較して、核、核小体以外の平滑筋細胞形質内の沈澱顆粒の量が著明に減少していた。形質膜、筋

小胞体にはまったく沈澱顆粒を認めなかった。

3) B群の電顕像

Fig. 4a, b はB群の電顕像を示した。比較的高濃度の Ca^{2+} を含む medium に incubate 後固定することによって、多くの沈澱顆粒が出現した。すなわち、沈澱顆粒は平滑筋細胞の形質膜に均一に付着していた。顆粒はまた同様に筋小胞体面、ミトコンドリアにも存在した。これらは、A群、C群にはみられなかった所見である。一方、形質内には非特異的な沈澱顆粒の分布はほとんど認められなかった。核にはまばらな沈澱顆粒がみられた。また染色群と未染色群を比較しても、沈澱顆粒の分布は変わらなかった。

3. A, B 群のpyroantimonate 沈澱顆粒のX線解析

A群の形質内に、不規則に分散している沈澱顆粒を数個えらび、電子線を照射し点分析を行った。Fig. 5 はそのとき得られたX線スペクトルの典型的な例である。ピークの位置から含まれる元素が同定され、また高さから含有量が求められる。Fig. 5a に示すごとく、1,739 eV にSi-K α 線が存在し、2,621 eV にCl-K α 線ピークと、3,640 eV に顕著なピークがみられた。この3,640 eV のピークはSb-L α 線 (3,600 eV) とCa-K α 線 (3,690 eV) の重なったものであり、さらに高エネルギー側に 3,840 eV と4,100 eV のピーク、すなわちSb-L β_1 線とSb-L β_2

Fig. 4 a) Smooth muscle cell fixed by procedure B. Bar represents 1 μm . Most of the precipitates are localized inside the cell membrane (arrow) and mitochondrial membrane. M: mitochondria, N: nucleus.

b) Enlargement of a). Bar represents 0.5 μm . M: mitochondria, Arrow: cell membrane, SR: sarcoplasmic reticulum.

Fig. 5 Energy spectrograph of X-ray obtained from the precipitate on the cell membrane.

a) From 1,000 to 4,500 eV. b) Enlargement of a). At 3,640 a Ca-Sb peak can be seen. Vertical line indicates the position of the Sb-L α line (3,600 eV).

線が認められた。低エネルギー領域にある Na-K α 線 (1,041 eV) や Mg-K α 線 (1,253 eV) ピークは大きな Si ピークとノイズのため確認が困難であった。Fig. 5b は、Fig. 5a の高エネルギー側を拡大したものであり、Sb のピーク (3,600 eV) を縦線によって示したものである。Ca-K α 線のピークは Sb-L α 線の右側にあることが認められた。

B 群の形質膜にみられた沈澱顆粒の 1 つをえらび点分析を行ったが、Fig. 5 で得られたものとまったく同様 3,640 eV に Sb-Ca 合成ピークが得られた。

IV 考 察

正常ウシ脳底動脈平滑筋細胞内微細構造に関しては、すでに発表している¹⁴⁾ので割愛する。

さて筋細胞内の Ca^{2+} の局在を形態学的に示す方法としては、蔭酸と $\text{Ca}^{2+28)}$ か、あるいは potassium pyroantimonate と Ca^{2+} による沈澱法がある。Potassium pyroantimonate が OsO_4 の存在下で、細胞膜を透過して細胞内陽イオンと反応して沈澱顆粒を形成することを利用して、1962年、Komnick⁵⁾ が電子顕微鏡下での細胞内電解質、特に Na イオンの検出に応用して以来、多くの研究者により細胞内イオンの局在についての検討がなされてきた。しかし、pyroantimonate 法の欠点としては、ほとんどの陽イオンと多かれ少なかれ反応することで、沈澱に含まれる物質の同定が困難であること、緩衝液や固定液の陽イオンと反応すること、pyroantimonate 自身が低い pH で沈澱することなどが言われてきた⁵⁾⁹⁾¹⁰⁾。

最近、電解質の同定法として electron probe microanalysis, X-ray microanalysisが発達し、electron opaque

precipitate の内容を同定することが可能となり、pyroantimonate 法と組み合わせて細胞内 Ca^{2+} の局在を観察することができるようになった。Mizuhira⁷⁾、杉ら¹²⁾¹³⁾ は平滑筋細胞内における Ca^{2+} の移動を電子顕微鏡下で観察する方法としては、X-ray microanalysis を併用すれば、pyroantimonate 法がきわめてすぐれた方法であると報告している。

次に観察された pyroantimonate 沈澱顆粒に含まれる金属元素について考察する。まずエネルギー分散 X 線検出器はシリコンで作製されているので、本実験の X 線スペクトルでみられた Si-K α の線のピーク (Fig. 5a) は、検出器の装置自体に由来する人工産物と考えられる。また Cl-K α 線のピークは、Epon 樹脂のみの切片の分析の際にも多量に検出されるので、切片包埋用の樹脂に由来するものと考えられた⁶⁾。

A 群の沈澱顆粒：脱分極液で incubate しない A 群では、Fig. 3a, b に示したように、沈澱顆粒は核と細胞形質内に不規則に分散していた。したがって、ウシ脳底動脈平滑筋細胞の核には常に陽イオンが豊富に存在するように考えられる。骨格筋細胞内 Ca^{2+} の局在を pyroantimonate 法によって検索した Yarom と Chandler¹⁷⁾ は、核とクロマチンに多くの沈澱顆粒が存在することを認め、これらの部位が Ca^{2+} の貯蔵部位として重要であるとした。しかし、核や核周囲の沈澱顆粒は、形質膜から離れ過ぎているので、平滑筋の興奮-収縮連関を起こすための Ca^{2+} の貯蔵部位とは考えられない。なぜなら平滑筋細胞の収縮・弛緩は、形質膜における電位変化、あるいは神経末端から放出される伝達物質の形質膜への作用によって調節されているのであり、形質膜から隔たった膜

構造では形質膜の電位変化,あるいは透過性変化の影響を速やかに受けることができないからである¹²⁾。一方, Debba^ら³⁾は,家兎大動脈を材料として同様の実験を行い,核の沈澱顆粒の大部分は Na-pyroantimonate であるとし, Yarom^ら¹⁷⁾の主張はあたっていないことを示した。

形質内に不規則に分散する沈澱顆粒は,著者らのX線分析によれば明らかに Ca^{2+} を含んでいた。しかも,この沈澱顆粒は Ca 貯蔵部位から遊離され,筋原線維間に分散しており,この Ca^{2+} は OsO_4 固定の際, Ca 貯蔵部位から放出されたものと考えられる。 Ca^{2+} を含む Krebs 液中での脳血管平滑筋は, OsO_4 を添加することにより著しく収縮することが判明した (Fig. 2)。 Na^+ , Mg^{2+} の存在については,エネルギー分散型X線分析器では少量の Na^+ や Mg^{2+} を検出することが困難であったが,本顆粒中に微量の Na^+ や Mg^{2+} は存在するものと考えられる。

以上のことからA群では, OsO_4 の影響により筋細胞内の Ca 貯蔵部位から Ca^{2+} の遊離が起こり形質内に分散し,筋収縮が始まり,まず形質内の Ca^{2+} と pyroantimonate が反応し,電顕でも見えない程度の小さい沈澱となり,それを核として $\text{Na}[\text{Sb}(\text{OH})_6]$ や $\text{Mg}[\text{Sb}(\text{OH})_6]_2$ などが集まって可視的沈澱を形成すると考えられる。つまり $\text{Ca}[\text{Sb}(\text{OH})_6]_2$ が沈澱顆粒形成の引き金の役をなしていると考えられる。

C群の沈澱顆粒: Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} を含まない溶液中で50分間 incubate した組織では,各イオンが急速に流出するため,核は例外として細胞形質内の沈澱顆粒は減少した。C群では, A群に比較すると貯蔵部位にある Ca^{2+} を含め細胞内陽イオンの減少が起こっていることが示された。

B群の沈澱顆粒: ウシ脳底動脈平滑筋を高 K^+ 脱分極液, Ca^{2+} を含み, Na^+ , Mg^{2+} を含まない溶液中で incubate したB群では, A群やC群にみられなかった形質膜内面, ミトコンドリア, 筋小胞体に多数の沈澱顆粒があらわれるが,形質内の顆粒はかえって減少した。また形質膜に付着している pyroantimonate 沈澱顆粒は, X線分析により明らかに Ca が含まれていることが示された。またB群では, Fig. 2 に示すごとく, OsO_4 添加によって脳血管平滑筋に張力は発生しなかった。これは, Ca^{2+} を含む脱分極液で50分間 incubate することにより,脳血管平滑筋は不活化された状態となり, OsO_4 を加えても細胞内貯蔵 Ca は遊離されることなく,弛緩状態を維持したままであると考えられる。外液から細胞内に入ってきた Ca^{2+} は,その貯蔵部位である形質膜内面,筋小

胞,ミトコンドリア等に吸収されてしまい,形質内には分散しない,したがって, Fig. 3, 4 にみられるような沈澱顆粒には Ca^{2+} が含まれ, Ca^{2+} がこれらの場所に局在していることが示された。

生理学的な機能面よりみた脳血管平滑筋の Ca^{2+} 貯蔵・結合部位について考察すると,脳血管平滑筋の細胞内には貯蔵された Ca^{2+} が存在し,その遊離が収縮機構を活性化する機序があることは,すでに生理・薬理学的研究により裏付けされている。Yamashita^ら¹⁶⁾は,ウシ脳底動脈を用いて薬物刺激に対する収縮および Ca^{2+} -インフラックスを検討し, 5 HT (セロトニン) や caffeine による収縮は,外液からの Ca^{2+} -インフラックスを伴わなくても起こることを認め,活性化 Ca^{2+} が細胞内に貯蔵されていることを示した。彼ら¹⁶⁾はその貯蔵部位として,筋小胞体,細胞膜内面を考えた。一方,筋小胞体やミトコンドリアに Ca^{2+} を取り込む能力があることは,家兎やウシ大動脈から抽出された subcellular fraction の研究や, microsomal preparation によって明らかにされている¹⁴⁾。

これら生理学的,薬理学的にみた Ca^{2+} の局在部位,すなわち収縮時には形質内に分散し,収縮蛋白を活性化していること,静止時には貯蔵部位(筋小胞体,ミトコンドリア,細胞形質膜)に結合して存在することは,著者らの行った Ca^{2+} の局在に関する電顕的な同定結果と一致している (Fig. 6)。

本研究は正常な生理的条件における Ca^{2+} の局在を定量的に表したとは言いがたい。しかしながら本実験の結果から,ウシ脳底動脈平滑筋の細胞膜および細胞内小器官(筋小胞体,ミトコンドリア)は, Ca^{2+} を貯蔵または

Fig. 6 Schematic representation of Ca^{2+} movement during contraction-relaxation.

Left: contracted state, Right: relaxed state, SR: sarcoplasmic reticulum, M: mitochondria, PM: plasma membrane, SV: surface vesicle, EC: extracellular sources.

結合する能力を有し、これは細胞内 Ca の貯蔵部位として、筋収縮機構に重要な役割を果していることが明らかとなった。

V 結 語

ウシ脳底動脈平滑筋の収縮、および弛緩時における筋細胞内 Ca^{2+} の局在を pyroantimonate 法により明らかにした。筋収縮時には、 Ca^{2+} は形質内筋原線維間に分散し、筋弛緩時には、 Ca^{2+} は筋小胞体、形質膜、ミトコンドリアに局在していた。これら平滑筋細胞膜および細胞内小器官は、生理学的には Ca 貯蔵部位と推定されていたが、本実験ではこれを形態学的に示すことができた。

本論文の要旨は、第38回日本脳神経外科学会総会（東京、1979年10月）で発表した。

稿を終えるに臨み、X線分析を指導し装置使用の便を計っていただいた帝京大学医学部生理学教室 杉晴夫教授、鈴木季直博士に謝意を表します。

文 献

- 1) CARSTEN, M. E.: Role of calcium binding by sarcoplasmic reticulum in the contraction and relaxation of uterine smooth muscle. *J Gen Physiol* 53: 414-426, 1969
- 2) COSTANTIN, L. L., FRANZINI-ARMSTRONG, C. & PODOLSKY, R. J.: Localization of calcium-accumulating structures in striated muscle fibers. *Science* 147: 158-160, 1965
- 3) DEBBAS, G., HOFFMAN, L., LANDON, E. J. & HURWITZ, L.: Electron microscopic localization of calcium in vascular smooth muscle. *Anat Rec* 182: 447-472, 1975
- 4) HESS, M. L. & FORD, G. D.: Calcium accumulation by subcellular fraction from vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 6: 275-282, 1974
- 5) KOMNICK, H.: Elektronenmikroskopische Lokalisation Von Na^+ und Cl^- in Zellen und Geweben. *Protoplasma* 55: 414-418, 1962
- 6) 水平敏知 & JOHN, C. R.: 分析電子顕微鏡. 日本メディカルセンター, 1978, 25p
- 7) MIZUHARA, V.: Elemental analysis of biological specimen by electron probe X-ray microanalysis. *Acta Histochem Cytochem* 9: 69-87, 1976
- 8) POPESCU, L. M., DICULESCU, I., ZEICK, U. & IONESCU, N.: Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cell of guinea-pig taenia coli. *Cell Tissue Res* 154: 357-378, 1974
- 9) SHIINA, S., MIZUHARA, V., AMAKAWA, T. & FUTAESAKU, Y.: An analysis of the histochemical procedure for sodium ion detection. *J Histochem Cytochem* 18: 644-649, 1970
- 10) SIMSON, A. V. & SIFER, S. S.: Selective subcellular localization of cations with variants of the potassium pyroantimonate. *J Histochem Cytochem* 23: 575-598, 1975
- 11) SOMLYO, A. P., SOMIYO, A. V., DEVINE, C. E., PETERS, P. D. & HALL, T. A.: Electron microscopy and electron probe analysis of mitochondrial cation accumulation in smooth muscle. *J Cell Biol* 61: 723-742, 1974
- 12) 杉 晴夫: 平滑筋細胞における Ca の局在とその収縮・弛緩時の移動に関する電子顕微鏡的組織化学. 帝京医学雑誌 1: 13-20, 1978
- 13) SUGI, H. & DAIMON, T.: Translocation of intracellularly stored calcium during contraction-relaxation cycle in guinea pig taenia coli. *Nature* 269: 436-438, 1977
- 14) TAKAGI, T., FUKUOKA, H., NAGAI, H. & HOTTA, K.: Basic study on cerebral vasospasm— Ca^{2+} movement during contraction-relaxation of isolated basilar arteries. *Neurol Med Chir* 19: 45-52, 1979
- 15) VAN BREEMEN, C., FARINAS, B. R., CASTEELS, R., GERBA, P., WUYTACK, F. & DETH, P.: Factors controlling cytoplasmic Ca^{2+} concentration. *Phil Trans R Soc Lond B* 265: 57-71, 1973
- 16) YAMASHITA, K., TAKAGI, T. & HOTTA, K.: Mobilization of cellular calcium and contraction-relaxation of vascular smooth muscle. *Jpn J Physiol* 27: 551-564, 1977
- 17) YAROM, R. & CHANDLER, J. A.: Electron probe microanalysis of skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 22: 147-154, 1974