原 著

順天堂医学 40(1)
P. 43 ~ 51 (1994)

血管内皮細胞における塩素チャネルによる

ATP 誘発性カルシウムイオン上昇の調節

Chloride currents are necessary for sustained ATP-induced
intracellular calcium increase in human aortic endothelial cells

柚 本 和 彦*

KAZUHIKO YUMOTO, M.D.

5—9代継代のヒト大動脈由来培養内皮細胞を用い ATP 誘発性細胞内 Ca イオン ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇に対する塩素チャネルの関与を, fura-2 を用いた $[Ca^{2+}]_i$ の蛍光測定により検討した. $10 \mu M$ ATP を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ は細胞内ストアからの放出による急速な上昇 (初期相) に続いて, 緩やかに減少する持続した高値 (持続相) を呈した. 投与前の $[Ca^{2+}]_i$ は 60 ± 7 nM (mean $\pm$ S. D.), 投与直後のピーク値は 309 ± 30 nM, 5 分後の持続相値は 170 ± 29 nM であった ($n=17$). 持続相は細胞外液の Ca の除去で消失したため, 細胞外からの Ca イオンの流入によると考えられた. 細胞外 Ca 存在下でも, 持続相中に細胞外液の塩素イオン濃度を 146 mM から 20 mM に減少させると (低 Cl 溶液), $[Ca^{2+}]_i$ は速やかに減少した ($n=8$). また低 Cl 溶液中で $10 \mu M$ ATP を投与すると, $[Ca^{2+}]_i$ は投与直後のピークでは不変であったが, 持続相を示すことなく速やかに減少した (前 65 ± 6 nM n. s., 投与直後 308 ± 40 nM n. s., 5 分後 85 ± 10 nM $p < 0.01$ $n=8$). さらに低 Cl 溶液中では ATP 反復投与時の 2 回目以降の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はいちじるしく減少した. 塩素チャネルブロッカーである niflumic acid $300 \mu M$ の $100 \mu M$ ATP との同時投与は, ピーク値に影響を与えず, 持続相のみを著明に抑制した (5 分後 63 ± 2 nM $p < 0.01$ $n=8$). 以上より塩素電流は ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に際し, 過分極によって細胞外からの Ca イオン流入による持続相を維持すると結論された.

キーワード: 血管内皮細胞, ATP, Cl 電流, 細胞内 Ca イオン濃度, Ca 流入

Key words: endothelial cell, ATP, chloride current, cytosolic free Ca^{2+} , Ca^{2+} influx

緒 言

血管内皮細胞は生体内において単に血管平滑筋と血液との隔壁となるのみならず, 内皮依存性弛緩因子 (EDRF, NO) やプロスタサイクリン (PGI_2) などの合成・分泌を行い血管壁の緊張を

調節している¹⁾. これらの血管調節物質は内皮細胞内のカルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇することで合成され, 分泌される²⁾³⁾. ATP やブラジキニンなどはアゴニストとして $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ EDRF や PGI_2 を合成し, 分泌させる. その際 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇はアゴニストと反応後ただちに上昇する初期相と, その後に続く緩やかな上昇を維持する持続相の 2 相からなる. すなわち ATP は内皮細胞上の purinergic receptor (P_2) と結合し inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP_3) を介し細胞内の Ca ストアから Ca イオンを放出

* 順天堂大学医学部内科学教室循環器内科学講座

Division of Cardiology, Department of Internal Medicine, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

[Nov. 18, 1993 原稿受領] (Dec. 16, 1993 掲載決定)

させる（初期相），またさらに細胞外からの Ca^{2+} の流入により，持続した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を続ける（持続相）⁴⁾⁵⁾．持続する EDRF の合成には細胞外からのカルシウム流入が必須である⁶⁾．この流入の調節は膜電位によってなされており，膜の脱分極により減少する^{6)~10)}．従来アゴニスト投与の際のこの Ca^{2+} の流入は，内向き整流性 K 電流と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇により活性化される K 電流による過分極で調節するとされ，主に K チャネルの役割が重視されてきた⁴⁾¹¹⁾．血管内皮細胞の Cl^- チャネルが幾つか報告されているが^{12)~16)}，それらの Cl^- チャネルの機能については明らかではない．最近，われわれは ATP により Cl^- 電流が誘発されることを，パッチクランプ法で発見した¹⁷⁾．今回われわれは ATP 刺激の際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ と Cl^- 電流との関係を蛍光色素 fura-2 を用いて検討し， Cl^- 電流が ATP 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇の際の持続相の維持に関与していることを明らかにした．

方 法

1) 培養内皮細胞

ヒト由来大動脈内皮細胞は Clonetics 社 (USA) より継代 4 代目で購入し，培地は 2% FBS, 10 ng/ml EGF を添加した E-GM (改変 MCDB 113) 培地 (Kurabo Osaka) を用いた．培養細胞は 25cm² フラスコにて 5% CO_2 加気中 37°C で培養した．培養細胞が confluent に達する前に新しいフラスコとカバーガラス上に継代し，実験にはカバーガラス上の細胞をそのまま使用した．これらの細胞は内皮細胞に典型的な敷石状配列をとり，DiI-Ac-LDL の取り込みを示し内皮細胞であることが確認された．実験には 5~9 代目の細胞を使用した．

2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定には蛍光指示薬である fura 2-AM を使用した．カバーガラス (9mm × 9mm) 上に蒔かれ confluent に達した内皮細胞を 3 μM の fura 2-AM を含んだ 1.5ml 培養液中で 60

分間室温にて遮光放置した後，Normal Tyrode 液 (下記参照) で 3 回洗浄し，15 分間 37°C でインキュベートした．fura 2-AM を負荷した細胞をカバーガラスのまま測定装置 (CAF-110 日本分光・Tokyo) 内のキュベットにいれ 3 ml/分 で溶液を灌流した． $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の絶対値は 340nm と 380nm の 2 波長励起による 500nm の蛍光側光を行い，各々の蛍光比 (R) を測定し Gryniewicz らの以下の式よりもとめた¹⁸⁾．

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d [(R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)] (Sf_2 / Sb_2)$$

この際，解離定数 (K_d) は 224nM とし， $R_{\max}$ は実験の最後に 10 μM イオノマイシンを 1.8mM CaCl_2 存在下で投与した際の最大蛍光強度比， $R_{\min}$ はその後 4 mM EGTA を投与した際の最小蛍光強度比， Sf_2/Sb_2 は 380nm における最大・最小の蛍光強度の比としてそれぞれをもとめた．

3) 実験に使用した溶液の組成 (mM) は Normal Tyrode 液 (NT) : NaCl 135 · KCl 5.4 · CaCl_2 1.8 · MgCl_2 1 · Na-HEPES 5 · グルコース 10 pH 7.4. Ca-free 溶液は CaCl_2 0 とし EGTA 5 mM を加えた．低 Cl^- 溶液は NaCl を Na-aspartate で置換し，他の組成は変えずに総塩素イオン濃度が 20mM となるようにした．また高 K 溶液は NaCl を KCl で置換し，総 K イオン濃度を 140mM とした．ATP · 2Na (Wako), niflumic acid (Aldrich) は各々 NT 溶液，低 Cl^- 溶液に溶かして用いた．

4) 統計学的手法は unpaired student's t test を用い $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した．各々の数値は mean $\pm$ S.D. で記した．

結 果

fura 2-AM を用いてヒト大動脈内皮細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を測定した．10 μM ATP を投与すると数秒以内に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の急激な上昇を認めた． $[\text{Ca}^{2+}]_i$ はピークに達した後，緩やかに減少していくが，投与 5 分後においても投与前より依然高値を維持した (投与前 : 70 $\pm$ 17nM, ピーク : 309 $\pm$ 30nM, 3 分後 : 200 $\pm$ 35nM, 5 分後 : 170 $\pm$ 29nM, $n = 17$)

図-1 ATP 投与による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇

A) $10 \mu M$ ATP を細胞外に投与した際の $[Ca^{2+}]_i$ の変化.

B) ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する $[Ca^{2+}]_o$ の影響. Ca -free 中で $10 \mu M$ ATP を投与した後, ATP 存在下で $[Ca^{2+}]_o$ を $1.8 mM$ に増加した.

図-2 高 K 溶液の ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇への影響

$[K^+]_o$ を $5.4 mM$ より $140 mM$ に増加した後 $10 \mu M$ ATP を投与した. 次いで ATP 存在下で $[K^+]_o$ を $5.4 mM$ に減少した.

(図-1-A). 次に細胞外を Ca -free 溶液として $10 \mu M$ ATP を投与すると, 同様に数秒以内にピークを認めるがその後の緩やかな減少相は認められず, 一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めたのち $[Ca^{2+}]_i$ は速やかに投与前のレベルにもどった. その後, 細胞外液を Ca -free 溶液から NT 溶液にすると $[Ca^{2+}]_i$ は再び上昇し緩やかな持続相を示した (図-1-B). このように ATP 投与直後の $[Ca^{2+}]_i$ の一過性の上昇は細胞外 Ca 濃度に影響されないで, 細胞内のストアからの Ca の放出に依り, 一方, その後に引き続く持続相は細胞外を Ca -free にすると, 消失したことから細胞外からの Ca イオンの流入によると示唆された. 図-2 では細胞外液に高 K 溶液 ($[K^+]_o = 140 mM$) を用い細胞を脱分極させた状態で ATP を投

与した. 高 K 溶液灌流中に $10 \mu M$ ATP を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ は直ちに上昇するが, 明らかな持続相を示すことなく投与前のレベルに戻った. その後 K 濃度を $5.4 mM$ に戻すと $[Ca^{2+}]_i$ は再び上昇し持続相を認めた ($n = 8$). 細胞外を高 K 溶液にすることで膜の脱分極が生じ, 持続相の Ca イオンの流入が減少したため $[Ca^{2+}]_i$ が減少したと考えられた. 次に持続相における Ca イオンの流入の調節に Cl チャンネルが関係する可能性を $NaCl$ を Na -aspartate で置換した低 Cl 溶液 ($[Cl^-]_o = 20 mM$) を用いて検討した. NT 溶液中で $10 \mu M$ ATP を投与すると初期相とそれに続く持続相を認める. ATP を投与して約 5 分後に細胞外液を NT 溶液 ($[Cl^-]_o = 146 mM$) から低 Cl 溶液 ($[Cl^-]_o = 20 mM$) にすると持続相の $[Ca^{2+}]_i$

図-3 低 Cl 溶液による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制

- A) 持続相での $[Cl^-]$ 0 減少の効果。
 146mM $[Cl^-]$ 0 中で $10 \mu M$ ATP を投与し、持続相中で $[Cl^-]$ 0 を 20mM に低下した。
 B) 低 Cl 溶液における ATP 投与の効果。
 $[Cl^-]$ 0 を 146mM より 20mM に減少後、 $10 \mu M$ ATP を投与した。次いで ATP 存在下に $[Cl^-]$ 0 を 146mM に増加した。
 C) 低 Cl 溶液中での ATP 反復投与の効果。

は急速に減少した (図-3-A)。次いで低 Cl 溶液から NT 液にもどすと $[Ca^{2+}]_i$ は徐々に増加し再び持続相が現れた (図-3-A)。同様の実験結果は 10 例で認められた。次にあらかじめ低 Cl 溶液中で灌流中に ATP を投与すると、数秒以内に $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めるが、その後に引き続く持続相は認められず、一過性のピークを形成して投与前のレベル近くにまで減少した。その後さらに細胞外液を低 Cl 溶液から NT 溶液にもどすと、 $[Ca^{2+}]_i$ は徐々に上昇し持続相を形成した (図-3-B)。同様の結果は 8 例でみられた。図-4 は NT 溶液中で ATP を投与した場合と、低 Cl 溶液中で ATP を投与した場合の $[Ca^{2+}]_i$ の時間経過を示した

図-4 ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間経過に対する $[Cl^-]$ 0 の影響

$10 \mu M$ ATP を NT 溶液中で投与した場合と低 Cl 溶液中で投与した場合の $[Ca^{2+}]_i$ との時間経過の比較。○ NT 溶液中 ($n=17$) ● 低 Cl 溶液中 ($n=8$) 各々は mean $\pm$ S.D. を示す。* ; $p < 0.01$

ものである。低 Cl 溶液は ATP 投与前および初期相の $[Ca^{2+}]_i$ には影響を及ぼさず、両者の間には明らかな差は認められなかった (投与前 : $70 \pm 17 nM$ 対 $65 \pm 6 nM$, ピーク : $309 \pm 30 nM$ 対 $308 \pm 40 nM$; NT ($n=17$) 対 20 mM Cl ($n=8$)。ATP 投与後の各時間の $[Ca^{2+}]_i$ を比較すると投与 1 分後は $280 \pm 40 nM$ 対 $240 \pm 50 nM$ と低 Cl 溶液群において低下の傾向があるが有意差はなかった。しかし投与 2 分後以降は両者の $[Ca^{2+}]_i$ は明らかに有意差を認めた (2 分後 : $233 \pm 36 nM$ 対 $139 \pm 28 nM$, $p < 0.01$ 5 分後 : $170 \pm 29 nM$ 対 $85 \pm 10 nM$, $p < 0.01$: NT 対 20 mM Cl)。このように細胞外液を低 Cl 溶液にすることにより、明らかに持続相の $[Ca^{2+}]_i$ は低下し、細胞外からの Ca イオンの流入の抑制が示唆された。

NT 溶液中で $10 \mu M$ ATP を反復的に数回投与しても初期相・持続相ともに変化を認めなかった。次に最初は NT 溶液中で $10 \mu M$ ATP を投与し、その後低 Cl 溶液で灌流して $10 \mu M$ ATP を 2 回投与した。その結果を図-3-C に示す。最初に NT 液中で $10 \mu M$ ATP を投与すると前述のように初期相および持続相を認めた。その後、灌流液を低

図-5 ATP誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対する niflumic acid (NFA) の影響

A) 300 μ M niflumic acid による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制例. NFA 投与数分後に100 μ M ATP を投与し、次いで NFA のみを洗い去った。
B) ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の時間経過。

100 μ M ATP を NT 溶液中で投与した場合と300 μ M niflumic acid 存在下で投与した時の時間経過の比較。○ NT 溶液中 (n=17) ● 300 μ M niflumic acid 存在下 (n=8)。各々は mean + S.D. を示す。* ; $p < 0.01$

Cl 溶液に変えて ATP を投与すると初期相のみを認め持続相は認めなかった。ここで一旦 ATP を洗い去った後、ATP を再投与すると $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は最初の反応の約25%に減少した (n=3)。

次に生理的な細胞外液中での塩素電流の役割を検討するために、塩素チャネルのブロッカーである niflumic acid (NFA)¹⁹⁾²⁰⁾ 存在下に ATP 誘発性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の反応をみた。niflumic acid (NFA) と ATP を同時投与する際は ATP は100 μ M の濃度で使用した。コントロールの状態では、

100 μ M ATP 投与は10 μ M ATP 投与の際よりも $[Ca^{2+}]_i$ を初期相では約20%有意に増加させたものの投与後2分以降は有意差がなく、持続相に関しては ATP 10 μ M と100 μ M との濃度による反応の差は認められなかった (投与前 58 ± 9 nM n.s., ピーク 366 ± 24 nM $p < 0.01$ 3分後 194 ± 15 nM n.s., 5分後 168 ± 16 nM n.s. n=10)。300 μ M NFA を100 μ M ATP と同時投与しても $[Ca^{2+}]_i$ は初期相に関しては、100 μ M ATP を単独投与した際と比較して有意な変化は認めなかった。しかし一過性の上昇後持続相を認めることなくただちに投与前のレベルにまでもどり、その後 NFA の除去により持続相が出現した (図-5-A)。

100 μ M ATP を NT 溶液中で単独投与した例と NFA 300 μ M 存在下に投与した例の $[Ca^{2+}]_i$ の時間経過を図-5-B に示した。NFA 存在下では ATP 投与前 63 ± 7 nM とピーク値 350 ± 64 nM は不変であったが、3分後 66 ± 10 nM $p < 0.01$ と5分後 69 ± 14 nM $p < 0.01$ (n=8) には有意に持続相は抑制された。

考 察

従来ウシ大動脈・肺動脈・ヒト臍帯静脈などの内皮細胞において $[Ca^{2+}]_i$ は ATP などのアゴニストにより細胞内ストアからの放出による初期相と、それに続く細胞外からの流入による持続相の2相性の上昇を示すことが報告されている³⁾⁷⁾⁹⁾。われわれは蛍光指示薬である fura-2 を用い、ヒト大動脈由来の内皮細胞においても ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に関して、同様の結果を認めた。ATP 投与直後の上昇は細胞外を Ca-free 溶液にしても認められたことから、細胞内のストアからの放出によると考えられる。またその後の持続した上昇相は細胞外を Ca-free にすることで消失したことから、細胞外からの Ca イオンの流入によると考えられた。細

胞外からの Ca^{2+} の流入は膜電位によってコントロールされる。すなわちアゴニストによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の持続相は脱分極により抑制される^{6)~10)}。今回のわれわれの実験においても細胞外溶液を高 K 溶液にすることにより ATP 投与による細胞外からの流入による持続相は抑制され、初期相を認めた後速やかに投与前のレベルに減少した。K コンダクタンスはヒト大動脈由来内皮細胞においても膜電位を介して Ca^{2+} の流入に明らかに関係していた。

今回われわれは細胞外 Cl 濃度の減少による持続相の低下を見いだした。すなわち ATP 投与数分後、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の持続相中に Cl 濃度を減少させると、明かな持続相の抑制を認めた。また ATP 投与以前から低 Cl 溶液にして ATP を投与すると初期相の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は不変であったが、持続相は抑制された。ここで Cl の平衡電位 (E_{Cl}) は、Nernst の式から $E_m = (RT/F) \ln ([\text{Cl}]_i / [\text{Cl}]_o)$ で与えられ、 $[\text{Cl}]_o$ を NT 溶液 ($[\text{Cl}]_o = 146\text{mM}$) から 20mM に減少させると静止電位は、Cl コンダクタンスの大きさに応じて、 E_{Cl} の変化分である最大 51mV 脱分極しうる。この脱分極が低 Cl 溶液交換による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の持続相の速やかな減少をもたらしたのであろう。

ヒト大動脈内皮細胞にパッチクランプ法を適用して ATP が Cl 電流を誘発することが明らかになっている¹⁷⁾。この ATP 誘発性 Cl 電流は他の Cl 電流と同様に大きな電流を形成しうる。ATP は Ca^{2+} 透過性の非選択性陽イオンチャネルを開孔するが²¹⁾²²⁾、この陽イオン電流は膜を脱分極するであろう。これに対し ATP 誘発性 Cl 電流¹⁷⁾ は Ca^{2+} 依存性 K 電流¹¹⁾ と共に、膜の過分極をもたらす駆動電位を増加して Ca^{2+} の流入を増加させるのであろう。

低 Cl 溶液中で 2 回の ATP 刺激を繰り返すと 2 回目のストアからの放出による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応はいちじるしく減少した。これは低 Cl 溶液中での 1 回目の刺激では細胞外からの Ca^{2+} 流入が抑制され、ストアへの補充が行われなかったため、すなわち低 Cl 溶液による Ca^{2+} 流入

の抑制のためと考えられる。

正常な Cl イオン濃度での Cl 電流の役割を明らかにするために、今回の実験では Ca^{2+} イオンにより活性化される Cl チャネルのブロッカーとして知られる niflumic acid (NFA) を使用した。NFA により ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の持続相が著明に抑制されたことより、Cl チャネルの持続相への寄与は大と考えられる。なお膵分泌細胞では NFA は非選択的な陽イオンチャネルのブロッカーとして働くとの報告もある²³⁾。他の Cl チャネルブロッカーとして知られている SITS・DIDS・NPA¹⁴⁾ はいずれも自家蛍光を持ち実験には使用できなかった。

今回われわれは血管内皮細胞の膜電位の調節に単に K 電流だけでなく Cl 電流も関与している可能性を明らかにした。この Cl 電流の主なもの ATP により誘発される Cl 電流であろう¹⁷⁾。 Ca^{2+} イオンの流入の増大は肥満細胞においても Cl 電流の活性化によると報告されている²⁴⁾。血管内皮細胞において、Cl チャネルは ATP による Ca^{2+} イオンの流入を調節する。従って Cl チャネルは EDRF (NO) や PGI_2 の生成を調節し、血管トーンスの制御に関係すると結論しうる。

結 語

1. ヒト大動脈由来内皮細胞において ATP は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を初期相と持続相の 2 相性に上昇させた。
2. 持続相の際に細胞外 K 濃度を増加させると持続相は抑制された。
3. 持続相の際に細胞外 Cl 濃度を減少させると、同様に持続相は抑制された。
4. 低 Cl 溶液中で ATP を投与すると、初期相は不変であったが、持続相は認められなかった。さらに再度 ATP を投与しても僅かな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇しか認められなかった。
5. 塩素チャネルブロッカーの niflumic acid は持続相を著明に抑制した。

以上より ATP 誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の維持に

はK電流のみでなく、Cl電流も関与している。

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜った第2生理学大地陸男教授に深甚なる謝意を表します。また、研究の機会を与えて頂いた山口 洋教授、ならびに循環器内科学教室一同の皆様に深く感謝いたします。なおこの結果の要旨は第69回日本生理学大会および第32回国際生理学会議にて発表した。

文 献

- 1) Vanhoutte, P.M., Rubanyi, G.M., Miller, V. M., *et al.*: Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**: 307~320, 1986
- 2) Lückhoff, A., Pohl, U., Mulsch, A., *et al.*: Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 189~196, 1988
- 3) Carter, T.D., Hallam, T.J., Cusack, N.J. *et al.*: Regulation of P2y-purinoreceptor-mediated prostacyclin release from human endothelial cells by cytoplasmic calcium concentration. *Br. J. Pharmacol.*, **95**: 1181~1190, 1988
- 4) Himmel, H.M., Whorton, A.R., Strauss, H.C.: Intracellular calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension*, **21**: 112~127, 1993
- 5) Schilling, W.P., Elliott, S.J.: Ca^{2+} signaling mechanisms of vascular endothelial cells and their role in oxidant-induced endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol.*, **262**: H1617~H1630, 1992
- 6) Lückhoff, A., Busse, R.: Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by the membrane potential. *Pflügers Arch.*, **416**: 305~311, 1990
- 7) Campbell, D.L., Strauss, H.C., Whorton, A. R.: Voltage dependence of bovine pulmonary artery endothelial cell function. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **23** (suppl 1): 133~144, 1991
- 8) Laskey, R.E., Adams, D.J., Johns, A., *et al.*: Membrane potential and Na-K pump activity modulate resting and bradykinin-stimulated changes in cytosolic free calcium in cultured endothelial cells from bovine atria. *J. Biol. Chem.*, **265**: 2613~2619, 1990
- 9) Schilling, W.P., Rajan, L., Strobl-Jager, E.: Characterization of the bradykinin-stimulated calcium influx pathway of cultured vascular endothelial cells: selectivity and kinetics. *J. Biol. Chem.*, **264**: 12838~12848, 1989
- 10) Schilling, W.P.: Effect of membrane potential on cytosolic calcium of bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **257**: H778~H784, 1989
- 11) Sauve, R., Simoneau, C., Parent, L., *et al.*: External ATP triggers a biphasic activation process of a calcium-dependent K channel in cultured bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.*, **412**: 469~481, 1988
- 12) Kawashima, Y., Ueda, S., Ochi, R.: Chloride-permeable large conductance channels in cultured endothelial cells from bovine pulmonary artery. *Proc. Int. Union Physiol. Sci.*, **17**: P 2301 (abstract), 1989
- 13) Ochi, R., Ueda, S., Nunokawa, T.: Depolarization-activated chloride current inhibitable by isoprenaline and 8-Br-cAMP in endothelial cells. *Jpn. J. Pharmacol.*, **58**: 331P (abstract), 1992
- 14) Ueda, S., Lee, S.L., Fanburg, B.L.: Chloride efflux in cyclic AMP-induced configurational change of bovine pulmonary artery endothelial cells. *Circ. Res.*, **66**: 957~967, 1990
- 15) Olesen, S.P., Bundgaard, M.: Chloride-selective channels of large conductance in bovine aortic endothelial cells. *Acta Physiol. Scand.*, **144**: 191~198, 1992
- 16) Groshcner, K., Kukovetz, W.R.: Voltage-sensitive chloride channels of large conductance in the membrane of pig aortic endothelial cells. *Pflügers Arch.*, **421**: 209~217, 1992
- 17) Yumoto, K., Yamaguchi, H., Ochi, R.: ATP

- activates chloride currents necessary for sustained increase of intracellular calcium in human aortic endothelial cells. *Int. Union Physiol. Sci.*, **89**: 7 P (abstract), 1993
- 18) Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.: A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440~3450, 1985
- 19) White, M.M., Aylwin, M.: Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca-activated Cl-channels in *Xenopus* Oocytes. *Mol. Pharmacology.*, **37**: 720~724, 1990
- 20) Korn, S.J., Bolden, A., Horn, R.: Control of action potentials and Ca influx by the Ca-dependent chloride current in mouse pituitary cells. *J. Physiol. (Lond)*, **439**: 423~437, 1991
- 21) Nilius, B.: Permeative properties of a non-selective cation channel in human vascular endothelial cells. *Pflügers Arch.*, **416**: 609~611, 1990
- 22) Mendelowitz, D., Bacal, K., Kunze, D.: Bradykinin-activated calcium influx pathway in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **262**: H942~H948, 1992
- 23) Gögelein, H., Dahlem, D., Englert, H.C., *et al.*: Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS.*, **268**: 79~82, 1990
- 24) Matthews, G., Neher, E., Penner, R.: Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J. Physiol. (Lond)*, **418**: 105~130, 1989

医学用語

Colpocephaly と側脳室後角

Holoprosencephaly (全前脳胞症) や Schizencephaly (分裂脳胞症) などと比較すると, Colpo (en) cephalus は日本語の訳もないぐらいで, 疾患名としても確立していない. 一つにはマイナーな Malformation であろうという漠然としたコンセンサスがあることと, 様々な原因で出現する新生児の水頭症の部分的な変化と明確に区別できないことにもよるのだろう. 通常 Colpocephaly と名づける場合側脳室後角の部分的拡大を指し, その壁を形成する白質の hypoplasia (低発達) があるためと解されている.

側脳室の後角は不思議な部分で, 個体差, 左右差がきわめて大きい. 後角の有無の統計ははっきりしないが, 左右差では左側のみというのが約60%と聞いたことがある. これは右利きの人の特徴だろうかとか左利きの人を調べたら, そのばあいでも左側の大きい方が多かったという. 未熟児で生後すぐに起きることのある Germinal Matrix Layer Hemorrhage はほとん

どが後角に近い側脳室三角部の脳室上衣下に出現する. この場所は full-term まで神経系の germinal cell を生産しつづけていると考えられている. つまり組織が鬆粗で血管が比較的豊富な点も出血の一因なのであろう.

Colpocephaly のとき後角壁を作る白質が少ないというのであれば, 当然そこを走る投射線維, 交連線維, 連合線維を送っている神経細胞も減少している (hypoplastic な) はずである. 結論すれば Colpocephaly は Histogenesis の error (組織発生の過誤) といえる.

“Kolpos” はホメロスの時代から使われているギリシャ語で, 英語の “bosom” でその語義をほぼ完全に表現することができる. “胸”, “奥”, “胸の中” など. しかし, “入江”, “湾” という意味は英語 “bosom” にはない.

(放射線科 久留 裕)

Original Paper

Summary**Chloride currents are necessary for sustained ATP-induced intracellular calcium increase in human aortic endothelial cells**

Extracellular ATP causes a biphasic increase in cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in endothelial cells. In cultured human aortic endothelial cells $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured using fura-2 AM. Ten μM ATP rapidly increased in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ from $60 \pm 7 \text{ nM}$ to $309 \pm 30 \text{ nM}$ ($n=17$) by releasing Ca^{2+} from internal stores (phasic phase). After the phasic phase, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ remained elevated, $200 \pm 35 \text{ nM}$ and $170 \pm 29 \text{ nM}$ at 3 and 5 min, respectively (tonic phase). Increasing the extracellular potassium ($[\text{K}^+]_o$) to 140 mM suppressed the tonic phase without affecting the phasic phase. When $[\text{Cl}^-]_o$ was reduced during the tonic phase from 146 mM to 20 mM by substituting aspartate for chloride, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rapidly returned to the basal level. Superfusion with $20 \text{ mM} [\text{Cl}^-]_o$ markedly suppressed the ATP-induced response in the tonic phase with little change in the basal and phasic levels (basal level $65 \pm 6 \text{ nM}$ n.s., phasic level $308 \pm 40 \text{ nM}$ n.s., 3 min $89 \pm 14 \text{ nM}$ $p < 0.01$, 5 min later $85 \pm 10 \text{ nM}$ $p < 0.01$, $n = 8$). Superfusion with $20 \text{ mM} [\text{Cl}^-]_o$ also inhibited the phasic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ after the second application of ATP. Three hundred μM niflumic acid, a chloride channel blocker, completely suppressed the tonic phase (basal level $63 \pm 7 \text{ nM}$ n.s., peak level $350 \pm 64 \text{ nM}$ n.s., 3 min $66 \pm 10 \text{ nM}$ $p < 0.01$, 5 min $69 \pm 14 \text{ nM}$ $p < 0.01$ $n = 8$). These results suggest that the chloride currents are necessary to maintain agonist-induced influx of Ca^{2+} which produces the tonic increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Key words : endothelial cell, ATP, chloride current, cytosolic free Ca^{2+} , Ca^{2+} influx

KAZUHIKO YUMOTO, M. D.

*Division of Cardiology, Department of Internal Medicine,
Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan*