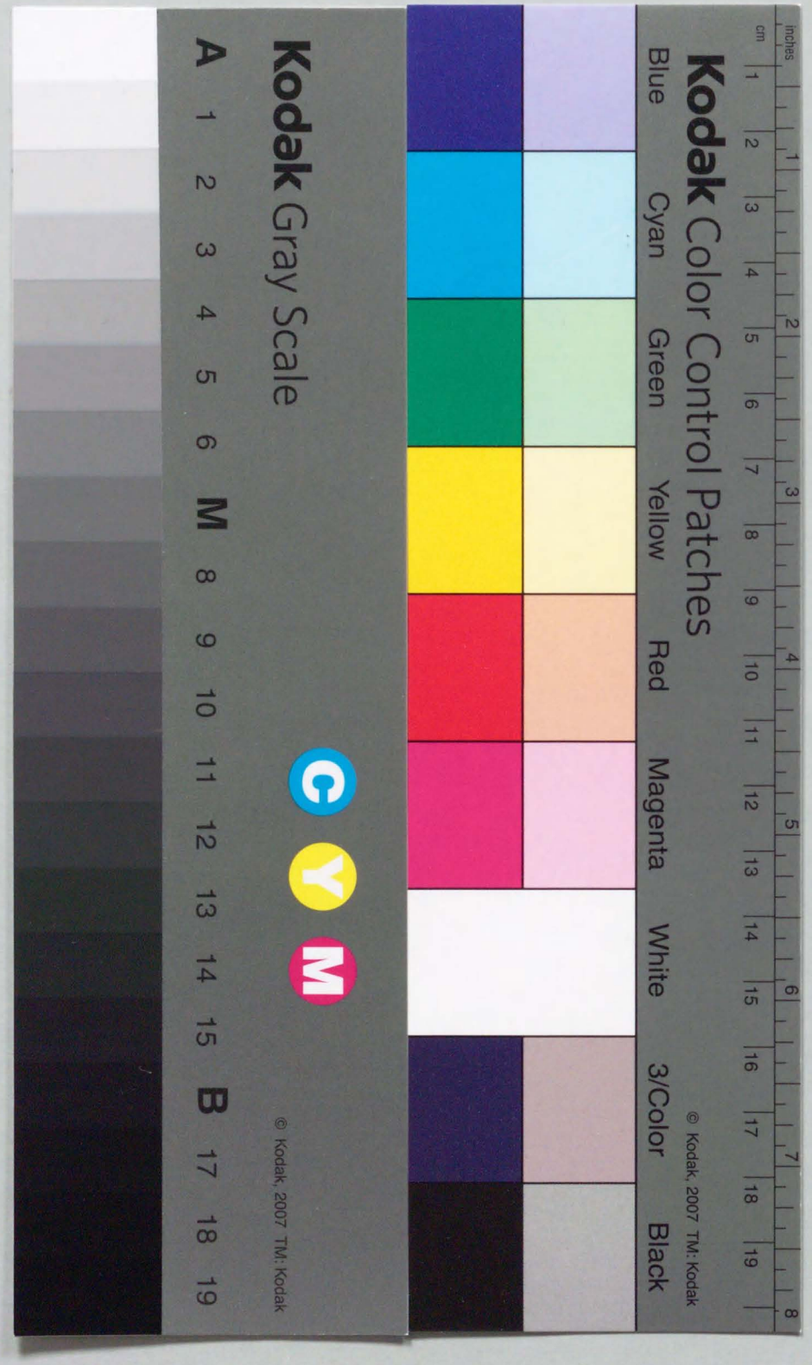


岩医大歯誌，Dent. J. Iwate Med. Univ. 20：299－311，1995

(1)

ブタ気管支平滑筋の収縮および細胞内 Ca^{2+} 動態におよぼすハロセンの影響

佐　藤　雅　仁

岩手医科大学歯学雑誌　第20巻　第3号　299頁－311頁　1995年

平成7年12月29日発行

ブタ気管支平滑筋の収縮および細胞内 Ca^{2+} 動態におよぼすハロセンの影響

佐藤　雅仁
岩手医科大学歯科麻酔学講座
（主任：城　茂治　教授）

（受付：1995年10月20日）
（受理：1995年11月27日）

Abstract : The effects of halothane on tension in porcine bronchial muscle and intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were investigated by the use of the fura-2 microfluormetric method. Porcine bronchial muscle tubes were loaded with a Ca^{2+}-indicator dye, fura-2 / AM. The light emission ratio ($R_{340/380}$) of fura-2 was recorded, and tension was simultaneously measured with a force displacement transducer. In normal physiological salt solution (normal PSS), halothane (1, 2, 3, 4%) induced tension with transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent manner. In Ca^{2+}-free solution containing 2mM Etyleneglycol-bis (2-aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (Ca^{2+}-free PSS), halothane caused a similar increase in tension and $[Ca^{2+}]_i$. Both KCl and bethanechol increased tension and $[Ca^{2+}]_i$. Bethanechol induced larger contraction than did KCl with similar $[Ca^{2+}]_i$. In Ca^{2+}-free PSS, the increase in KCl-induced tension and $[Ca^{2+}]_i$ were abolished. In contrast, increase in bethanechol-induced tension and $[Ca^{2+}]_i$ in Ca^{2+}-free PSS were similar to that in normal PSS. Halothane inhibited the increase in KCl tension, and bethanechol-induced tension and $[Ca^{2+}]_i$ in a concentration-dependent manner. Although halothane inhibited all the changes induced by bethanechol, the inhibition of $[Ca^{2+}]_i$ was less than that of muscle tension. In conclusion, on porcine bronchial muscle, halothane seems to induce bronchoconstriction by releasing Ca^{2+} from intracellular stores. Halothane can directly inhibit KCl-induced contraction by suppressing $[Ca^{2+}]_i$ that may be attributed to inhibition of the influx of extracellular Ca^{2+}. Halothane also seems to inhibit contraction induced by muscarinic receptor stimulation. This inhibitory effect of halothane may be attributed mainly to the decrease in retension of intracellular Ca^{2+} and the decrease in Ca^{2+} sensitivity of contractile machinery.

Key words : halothane, fura-2, intracellular calcium, bronchial muscle

緒　　言

全身麻酔薬としての吸入麻酔薬は，臨床麻酔の場で広く用いられており，歯科麻酔領域においても口腔外科手術はもとより，歯科治療，特に障害者歯科などの全身管理のための全身麻酔の応用が増加している[1-3]。しかし，吸入麻酔薬は，全身麻酔中には常時気道内に存在し，気道の平滑筋へ直接的な影響をおよぼす可能性があるにもかかわらず，これらの組織に対する吸入麻酔薬の直接作用については，いまだにその作用機序が十分に解明されていない[4-6]。

Effects of halothane on contraction and intracellular Ca^{2+} mobilization in porcine bronchial smooth muscle.

Masahito Sato
(Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3－27（〒020）　　*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 20：299－311，1995

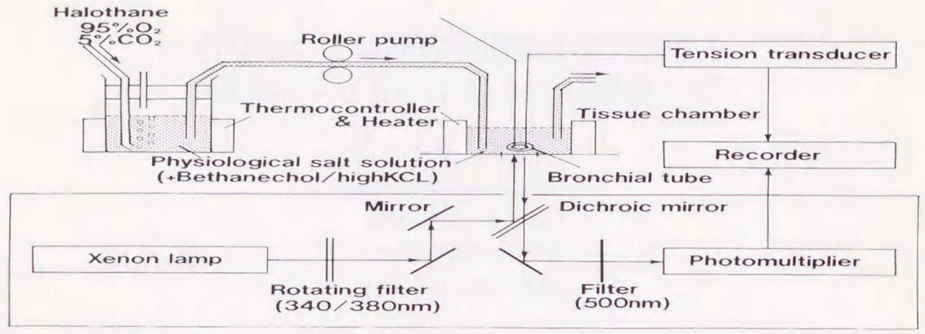


Fig.1. Schematic diagram of the experimental apparatus. The bronchial tube (ring) was mounted on two tungsten hooks in a temperature controlled tissue chamber. Anesthetic-saturated solution was pumped into the tissue chamber. One end of the muscle tube was connected to a force displacement transducer to measure the isometric tension. The excitation light was obtained from a xenon lamp equipped with rotating filter. Two wavelengths of excitation light (340 nm and 380 nm) were obtained by the rotating filter. The muscle tube was exposed to this excitation light. The emitted light from the tube was introduced through a 500nm band-pass filter into a photomultiplier.

その理由として，揮発性吸入麻酔薬の麻酔作用のメカニズム自体がいまだ完全に解明されていない[7]ことに加えて，動物種，臓器などにより平滑筋の収縮機構[8]や吸入麻酔薬に対する収縮反応が異なることなどが考えられる。また，気道の平滑筋については，その近位と遠位では吸入麻酔薬に対する反応が異なり[9]，他臓器の平滑筋における吸入麻酔薬の作用に比べて研究がさらに困難となるため，気管支平滑筋に対する吸入麻酔薬の影響に関する研究はほとんど見あたらない。

一方，揮発性吸入麻酔薬のうち，ハロセンは臨床上強い気道拡張作用を有することがよく知られている[10]。この気道拡張作用に関してはハロセンの開発以来，継続して研究が進められ，その有用性が確認されている[11-14]。

また，近年，新しいカルシウムイオン感受性蛍光指示薬の開発により[15]，平滑筋の収縮・弛緩反応と同時に細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を測定することが可能となり，平滑筋の収縮・弛緩反応における細胞内カルシウムイオンの役割が究明できるようになった。さらに新しいスキンド標本[16]，特異的酵素基質[17]，パッチクランプ法[18]の開発に伴い，横紋筋に比べるとはるかに複雑な平滑筋の収縮制御機構を，細胞レベルで追究することが可能になってきた。

本研究では吸入麻酔薬ハロセンの気管支平滑筋におよぼす直接作用を明らかにするために，カルシウムイオン感受性蛍光指示薬Fura-2を用いて，$[Ca^{2+}]_i$と収縮張力の変化を手掛かりに，①気管支平滑筋の収縮機構，②ハロセン自体の気管支平滑筋に対する作用，③脱分極刺激およびムスカリン受容体刺激による気管支平滑筋の収縮におよぼすハロセンの影響などについて検討した。

材料と方法

1．Tissue chamber溶液中のハロセン濃度の測定

Tissue chamber（Fig.1）の実験溶液中のハロセン（Halothane®，日本ヘキスト）濃度とハロセン気化器（New HONEY MATIC，木村医科器械）のダイアル目盛りとの相関を知るために以下の実験を行った。

1）標準液の調整

ハロセンの溶媒として，生理的塩類溶液［140 mM NaCl，4.7 mM KCl，2.5 mM $CaCl_2$，2.5 mM $MgCl_2$，11.1 mM ブドウ糖，3.0 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid（HEPES，同仁化学）；normal PSS］[19]を用いた。また，カルシウムイオンを含まない溶液（Ca^{2+}-free PSS）は，normal PSSの組成より2.5 mM $CaCl_2$を除き，2.0 mM 0，0'-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N，N，N'-N'-tetraacetic acid（EGTA，同仁化学）を加え作製した。

奥村らの方法[20]に準じて，normal PSS 100mlにハロセンを各々10mg，20mg，30mg，40mg，50mgずつ加えたものをつくり密閉容器に入れ，十分に攪拌して完全に溶解したものを標準液とした。

2）ハロセンのバブリングによる試料溶液の作製

ハロセン気化器のダイアル目盛りを1%，2%，3%，4%とし，流量2ℓ/minで95% O_2，5% CO_2の混合ガスをnormal PSS 100 ml（pH＝7.4，37.0℃）に10分間バブリングして，各々のダイアル目盛り（%）における試料溶液を作製した。

3）ガスクロマトグラフによる分析

1）で作製した標準液を各濃度につき6回ずつ，ガスクロマトグラフ（G-5000，日立）で分析し，クロマトデータ処理装置（D-2500，日立）により検量線[20]を求めた（Fig.2）。つぎに2）で作製した試料溶液を本実験と同様に密閉チューブを介してローラーポンプで恒温槽内のtissue chamberへ送り，気化器の各ダイアル目盛り（%）につき6回ずつtissue chamberより試料溶液を採取してガスクロマトグラフを用いて分析した。そしてpeak height（Table 1）および検量線（Fig.2）よりハロセンの気化器ダイアル目盛り（%）と実験溶液中のハロセン濃度との相関について検討した。

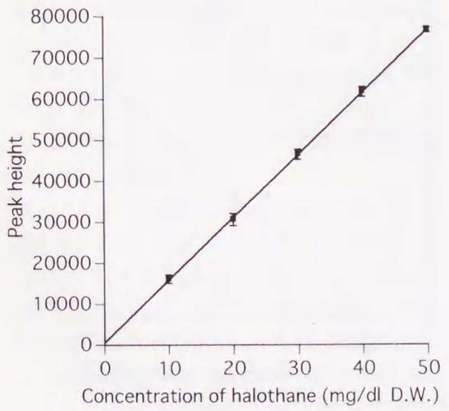


Fig.2. Calibration curve of halothane concentration.
y＝1522.2x＋58.7 (r＝0.999)
Data are presented as mean ± SEM.

Table 1. Relations between vaporizer scale (%) and peak height obtained by gas chromatography-analysis.
[a]Mean ±SEM.

Vaporizer scale(%)	Peak height	N
1	14518±957[a]	6
2	29627±546	6
3	40593±1290	6
4	54684±941	6

4）ガスクロマトグラフの分析条件

検出器はFID，キャリアガスはN_2を用い，流量は15ml/minに設定した。また，試料注入口，検出器の温度は150℃，カラム温度は60℃とした。充填剤はPEG-1000 10%（担体Uniport B 60/80 mesh）で，内径3㎜，長さ2ｍのガラスカラム（ジーエルサイエンス）を使用し，試料注入量は5μℓとした。

2．気管支平滑筋標本に対するハロセンの作用

1）実験材料

屠殺ブタの摘出肺を用い，肺実質内に侵入後の葉気管支を摘出した。付着した肺実質および肺血管を除去した後，軟骨組織を全周にわたり剝離除去し，直径4から5㎜，長さ6から7㎜の気管支平滑筋の輪状標本を作製した。

2）蛍光カルシウム指示薬Fura-2の負荷

Fura-2/AM(同仁化学)50μℓ，0.01%Pluronic F-127(BASF)を溶解したnormal PSS中に標本を入れ，37℃暗所に3時間放置してFura-2/AMを負荷した。

ついで静止張力を1.0ｇとしてtissue chamber（容量0.4 ml）内に固定後，normal

PSS で約1時間灌流した。

3）測定方法

収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の同時測定は著者らの方法[21]によった。

①収縮張力の測定：標本は蛍光カルシウムイオン測定装置（CAF-100，日本分光）上の恒温槽内の tissue chamber で，一端をマニュピレーター（M-152，ナリシゲ）に固定し，他端をタングステンワイヤーを介して張力トランスデューサー（UL-2GR，ミネベア）に固定した。発生した収縮張力はこのトランスデューサーにより測定し，血圧用増幅ユニット（N 4438，日本電気三栄）を介してレコーダー（RT 2108 R，日本電気三栄）を用いて記録した（Fig.1）。

② $[Ca^{2+}]_i$ 測定：蛍光カルシウムイオン測定装置内のキセノンランプから発する励起光を340 nm と 380 nm のバンドパスフィルター付き回転盤を介して，Fura-2 を負荷した標本に照射して二波長励起を行った。組織からの蛍光はフィルター（500 nm）を介して光電子増倍管に導き，340 nm と 380 nm 励起蛍光強度そしてその蛍光強度比（R 340/ 380）を張力とともに，同時に測定記録（Fig.1）して蛍光強度比の変化を $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標とした[19,21]。

4）各標本の基準値の測定

90 mM KCl（和光純薬工業）溶液は，normal PSS の NaCl と KCl を等モル量置換して作製した[19]。実験の開始時に各々の標本に対して，90 mM KCl 溶液を5分間灌流（5 ml/min）し，生じた収縮張力および蛍光強度比の変化量を測定し，それぞれの標本における基準値（100%）とした[19]。

5）ハロセン自体の気管支平滑筋に対する作用

実験方法1の2）と同様の方法で normal PSS にハロセンを負荷し（気化器ダイヤル目盛りで1%，2%，3%，4%），pH を 7.4 に調整した後，各標本を灌流し，収縮張力および蛍光強度比の変化を同時に測定して記録した。つぎに灌流液を Ca^{2+}-free PSS に交換後，同様に4%ハロセン負荷による張力および蛍光強度比の変化を測定した。

6）脱分極刺激による気管支平滑筋の収縮およびハロセンの影響

脱分極性刺激薬として 50 mM KCl を用いた。normal PSS 中の標本に 50 mM KCl 溶液を灌流し，収縮張力と蛍光強度比の変化を同時に測定記録して対照とした。つぎにハロセンを負荷（1%，2%，3%，4%）した normal PSS 中の標本に 50 mM KCl 溶液を灌流し，張力および蛍光強度比の変化を同時に測定して記録した。また Ca^{2+}-free PSS 中の標本にも 50 mM KCl 溶液の灌流を行った。さらに Ca^{2+}-free PSS 中で4%ハロセンを負荷した標本に 50 mM KCl 溶液を灌流し，収縮張力と蛍光強度比の同時測定を行った。

7）受容体刺激による気管支平滑筋収縮およびそれに対するハロセンの影響

ムスカリン受容体作動薬として 10^{-4} M ベタネコール（SIGMA）を用いた。5）と同様に normal PSS 中の標本，ハロセンを負荷（1%，2%，3%，4%）した normal PSS 中の標本，Ca^{2+}-free PSS 中の標本，Ca^{2+}-free PSS にさらに4%ハロセンを負荷した溶液中の標本にそれぞれ 10^{-4} M ベタネコール溶液を灌流し，生じた収縮張力および蛍光強度比の変化を同時に測定して記録した。

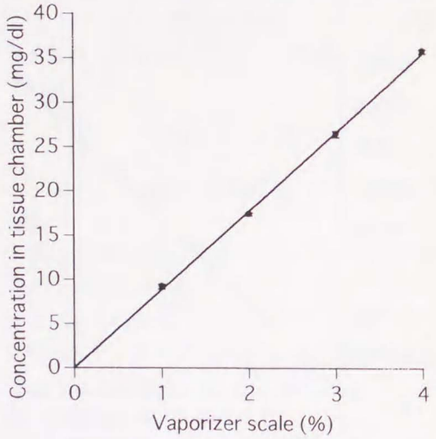


Fig.3. Relationship between vaporizer scale and halothane concentration in tissue chamber.
y＝8.815x＋0.03 (r＝0.992)
Data are presented as mean ± SEM.

3．統計処理

統計処理には，正規性の検定，異常データの検出（棄却検定），等分散検定の後，平均値の有意差の検定（F検定）を行った。

結　　果

1．Tissue chamber 溶液中のハロセン濃度

Tissue chamber 溶液中のハロセン濃度（mg/dl）と気化器のダイアル目盛り（%）の相関を Fig.3 に示した。得られた回帰直線の式は，y＝8.815 x＋0.03 で，相関係数 r＝0.992 であった。

2．気管支平滑筋標本に対するハロセンの作用

1）ハロセンの気管支平滑筋標本に対する作用

静止張力 1.0 g で安定した気管支平滑筋標本にハロセンを負荷した溶液を灌流すると，収縮張力が発生し，一過性に $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた（Fig.4-A，B）。また，この収縮張力，$[Ca^{2+}]_i$ の増加は両者ともにハロセン濃度依存性の傾向を示した。収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の増加量を比較すると収縮張力の増加に比べ，$[Ca^{2+}]_i$ の増加のほうがより顕著であった（Table 2，Fig.5）。Ca^{2+}-free PSS においても4%ハロセン負荷により収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は同様に増加し（Fig.4-C），その大きさは normal PSS 中における4%ハロセン負荷による場合と有意差はなかった（Fig.6）。

2）脱分極刺激による気管支平滑筋の収縮およびハロセンの影響

normal PSS 中では 50 mM KCl 刺激により，収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ はともに基準値の 89.2 ± 5.4%，76.3 ± 5.4% まで増加した。この変化は収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ ともにハロセンを負荷した溶液中では有意に抑制され（Fig.7），ハロセン濃度に依存性の傾向があることを示した（Fig.8，Table 3）。一方，Ca^{2+}-free PSS 中では，50 mM KCl による刺激によって，張力および $[Ca^{2+}]_i$ ともに静止時から変化しなかった。同様に Ca^{2+}-free PSS 中ではハロセンを負荷し

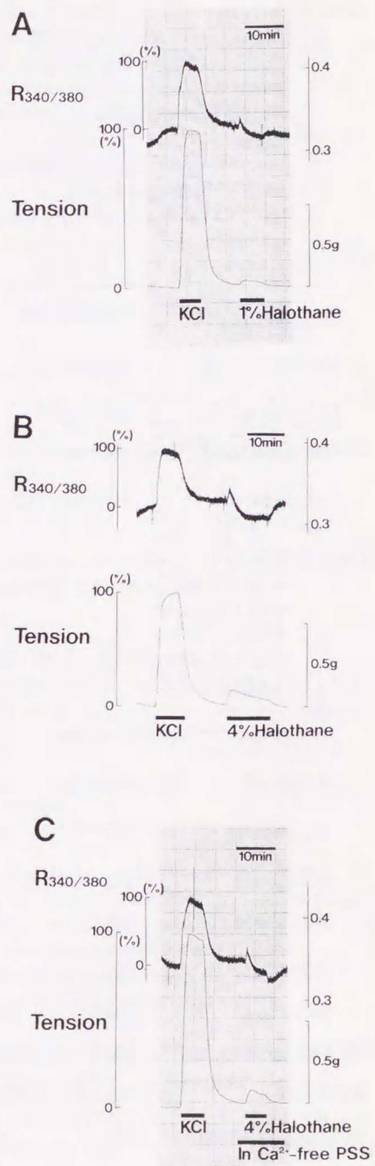


Fig.4. Representative recordings of increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) induced by halothane.
A : Effect of 1% halothane in normal PSS.
B : Effect of 4% halothane in normal PSS.
C : Effect of 4% halothane in Ca^{2+}-free PSS.

Table 2. Increases in $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) and tension induced by halothane in porcine bronchial muscle. The values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl which was performed at the beginning of each treatment.
There was no statistical significance between $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by 4% halothane in normal PSS and those in Ca^{2+}-free PSS.
[a]Mean ± SEM.
[b]Number of bronchial muscle rings.
[c]Statistical irregular data.
*$p<0.05$ compared with 1% halothane.

Treatment	Solution	Tension(%)	N[b]	Ratio($R_{340/380}$, %)	N
Halothane, 1 %	normal PSS	6.88±1.04[a]	10	10.50±1.94	10
Halothane, 2 %	normal PSS	9.74±1.29	10	17.32±1.62*	10
Halothane, 3 %	normal PSS	10.70±0.98*	9 (24.40[c])	25.09±2.62*	10
Halothane, 4 %	normal PSS	15.34±1.94*	10	34.94±4.44*	10
Halothane, 4 %	Ca^{2+}-free PSS	14.30±1.75	10	29.89±3.20	10

Table 3. Effects of various treatments on increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$). Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl which was performed at the beginning of each treatment.
[a]Mean ± SEM.
[b]Number of bronchial muscle rings.
*$p<0.05$ compared with control.

Stimulant	Halothane conc.	Solution	Tension(%)	Ratio($R_{340/380}$, %)	N[b]
KCl, 50mM	0%(=control)	normal PSS	89.23±5.70[a]	76.33±5.40	8
KCl, 50mM	1%	normal PSS	83.41±4.65	69.64±5.02	8
KCl, 50mM	2%	normal PSS	75.96±5.18	67.14±3.73	8
KCl, 50mM	3%	normal PSS	57.85±5.37*	58.97±5.43*	8
KCl, 50mM	4%	normal PSS	42.71±3.86*	52.98±5.41*	8
KCl, 50mM	0%	Ca^{2+}-free PSS	no response	no response	
KCl, 50mM	4%	Ca^{2+}-free PSS	no response	no response	
Bethanechol, 10^{-4}M	0%(=control)	normal PSS	280.62±10.86	133.71± 8.34	12
Bethanechol, 10^{-4}M	1%	normal PSS	214.60±11.48*	126.95± 6.90	10
Bethanechol, 10^{-4}M	2%	normal PSS	192.18±10.20*	105.68± 7.43*	10
Bethanechol, 10^{-4}M	3%	normal PSS	140.62± 8.13*	96.46± 5.25*	10
Bethanechol, 10^{-4}M	4%	normal PSS	108.28± 5.78*	88.33± 5.04*	12
Bethanechol, 10^{-4}M	0%	Ca^{2+}-free PSS	265.93±12.27	123.98±10.17	12
Bethanechol, 10^{-4}M	4%	Ca^{2+}-free PSS	98.96± 7.22*	89.31± 7.61*	10

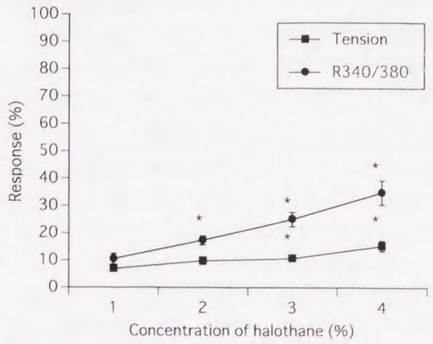


Fig.5. Increases in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) induced by various concentration of halothane. Halothane (1, 2, 3, 4%) induced concentration-dependent increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$).
Data are presented as mean ± SEM.
*$p<0.05$ compared with values induced by 1% halothane.

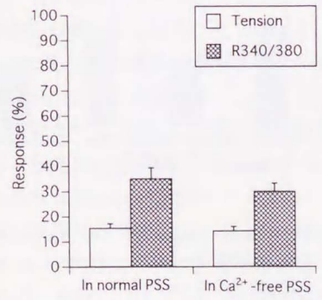


Fig.6. Increases in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) induced by 4% halothane in normal PSS or Ca^{2+}-free PSS.
Data are presented as mean + SEM.
The data in normal PSS are from Fig.5.
No statistical significance.

た後，50 mM KCl 刺激を与えても標本に反応は生じなかった。

3）受容体刺激による気管支平滑筋の収縮およびハロセンの影響

Fig.9-A に normal PSS 中でのベタネコール

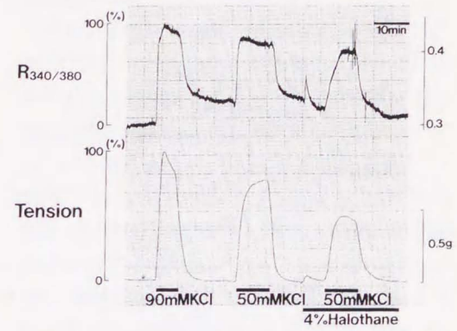


Fig.7. Representative recordings of 50 mM KCl-induced increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) and inhibitory effects of halothane on those response in normal PSS.

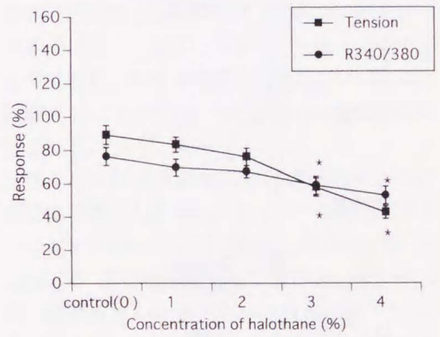
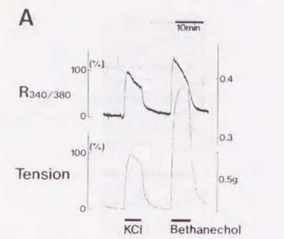
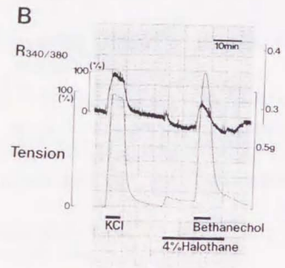
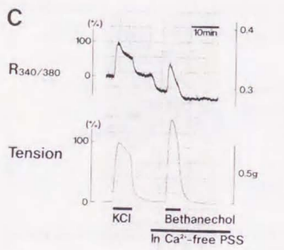


Fig.8. Inhibitory effect of halothane on KCl-induced increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$). Halothane inhibited in a concentration-dependent manner.
Data are presented as Mean±SEM.
*$p<0.05$ compared with control.

刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ 変化の同時測定記録の1例を示した。10^{-4} M ベタネコール刺激により，収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ とも，それぞれ基準値の 280.6 ± 10.9%，133.7 ± 8.3% まで増加したが，脱分極刺激と比較すると $[Ca^{2+}]_i$ の増加量より収縮張力の著しい増加を認めた（Table 3）。ベタネコール刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加はともにハロセンの存在下では，ハロセン濃度に依存して有意に抑制された。また，その抑制の程度は，脱分極







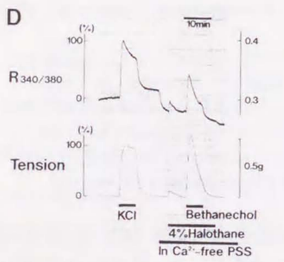


Fig.9. Representative recordings of bethanechol-induced increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) and inhibitory effect of halothane on those response.
A : Increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) induced by 10^{-4}M bethanechol in normal PSS.
B : Inhibitory effect of 4% halothane on bethanechol-induced changes in normal PSS.
C : Increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) induced by 10^{-4}M bethanechol in Ca^{2+}-free PSS.
D : Inhibitory effect of 4% halothane on bethanechol-indused changes in Ca^{2+}-free PSS.

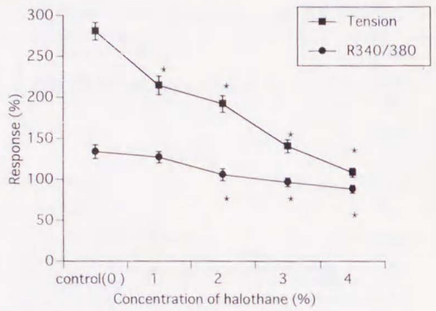


Fig.10. Inhibitory effect of halothane on bethanechol-induced increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$). Halothane inhibited in a concentration-dependent manner. Halothane inhibited $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) more strongly than tension induced by bethanechol.
Data are presented as mean ± SEM.
*$p<0.05$ compared with control.

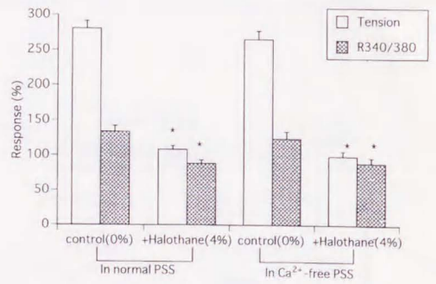


Fig.11. Inhibitory effect of 4% halothane on bethanechol-induced changes in normal PSS or Ca^{2+}-free PSS.
Regardless of solution (normal PSS or Ca^{2+}-free PSS), 4% halothane reduced the amplitude of bethanechol-induced increase in tension and $R_{340/380}$ ($[Ca^{2+}]_i$) similarly.
Data are presented as mean + SEM.
The data in normal PSS are from Fig. 10.
*$p<0.05$ compared with control in each solution.

刺激の場合とは異なり $[Ca^{2+}]_i$ の増加よりも，収縮張力の増加を顕著に抑制する傾向を示した（Fig.9-B，10，Table 3）。また，Ca^{2+}-free PSS 中では，脱分極刺激とは異なり，ベタネコール刺激により収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた（Fig.9-C）。そして peak 時の測定値では，normal PSS 中でのベタネコール刺激による場合と有意差が認められなかった（Fig.11）。しかし，記録波形において Ca^{2+}-free PSS 中では収縮張力，$[Ca^{2+}]_i$ ともに，ベタネコール投与中での経時的な減衰が著しかった（Fig.9-C）。また，Ca^{2+}-free PSS 中でもハロセンはベタネコール刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加を normal PSS 中での場合と同程度に抑制した（Fig.9-D，11，Table 3）。

考　　察

1．気管支平滑筋の収縮制御機構について

平滑筋の収縮機構は，横紋筋[22]に比べてはるかに複雑ではあるが，$[Ca^{2+}]_i$ の増減が平滑筋の収縮調節機構においても最も重要な因子であることに変わりはない。すなわち，細胞質内の Ca^{2+} は，Ca^{2+}-カルモジュリン（CaM）複合体を形成しミオシン軽鎖（MLC）キナーゼを活性化する。この酵素によりミオシンがリン酸化され平滑筋の収縮が生じる[23]。このことは，高濃度 K^+ での脱分極刺激による平滑筋の収縮時によく見られ，収縮反応は常に $[Ca^{2+}]_i$ 増加に追従して現れる[6,24]。また，この脱分極刺激による平滑筋の収縮は，細胞膜上の L-type voltage dependent calcium channel（L-VDC）を介して細胞外から Ca^{2+} が流入し，$[Ca^{2+}]_i$ が増加することにより生じる[24]。本実験においても，50 mM KCl 投与により $[Ca^{2+}]_i$ の増加に伴って収縮張力の増加が認められた。さらに Ca^{2+}-free PSS 中では 50 mM KCl の刺激による反応はみられなかった。このことは，血管平滑筋や気管平滑筋と同様にブタ気管支平滑筋においても，脱分極刺激による収縮は，細胞外 Ca^{2+} の流入によって $[Ca^{2+}]_i$ が増加することを示している。

また，受容体刺激によっても receptor operated calcium channel を介して，細胞外から Ca^{2+} が流入するといわれている[25]。細胞外から流入した Ca^{2+} は，主に平滑筋の持続性収縮の維持に寄与する[26]と考えられている。

一方，平滑筋の細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によっても $[Ca^{2+}]_i$ が増加するが，これにはホスファチジルイノシトールリン脂質（PI）代謝回転の結果，生じるイノシトール 1，4，5 三リン酸による Ca^{2+} 放出（IICR）機構[26,27]と細胞外から流入する Ca^{2+} による Ca^{2+} 放出（CICR）機構[28]とがある。これら細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出は収縮の初期相に寄与する[26]。本実験では，Ca^{2+}-free PSS 中においてもベタネコール刺激による peak 時の収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は，normal PSS 中のそれと同程度に増加したが，収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ はともに速やかに減衰した。このことは，ベタネコールによる気管支平滑筋の初期相の収縮が，細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出による $[Ca^{2+}]_i$ の増加によって生じていることを強く示唆するものである。また，収縮の持続相においては，細胞外 Ca^{2+} の存在が必要である可能性を示唆している。

さらに，受容体刺激の際には収縮系の Ca^{2+} 感受性の増大もみられ，$[Ca^{2+}]_i$ の増加よりさらに大きく効率のよい収縮張力が得られる[26,29]。この Ca^{2+} 感受性が増大する機序として，受容体作動薬による G 蛋白質の活性化による MLC ホスファターゼの抑制[30]，Ca^{2+}/CaM 依存性キナーゼⅡの抑制[31]が考えられている。

また，PI 代謝回転に伴い C キナーゼ（PKC）が活性化されると収縮系の Ca^{2+} 感受性が増大する[23]。その理由として，PKC の活性化によりアクトミオシン ATPase の抑制作用が失われること[32]や，MLC ホスファターゼの活性が抑制されること[33]が報告されている。

本実験の結果では，ベタネコール刺激によりブタ気管支平滑筋の収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の両者とも増大した。各々の増加量について脱分極刺激の場合と比較すると，$[Ca^{2+}]_i$ の増加量に比して収縮張力が著しく増大していることが認められた。本研究では収縮機構を $[Ca^{2+}]_i$ の増減を手掛かりに検討したので，前述したような Ca^{2+} 感受性制御機構のどのような機序が働

いたかは不明であるが，実験の結果は，受容体作動薬により収縮系の Ca^{2+} 感受性が増大したとのOzakiらの報告[26]に一致する。

以上より他の血管平滑筋や気管平滑筋とほぼ同様にブタ気管支平滑筋においても，脱分極刺激の際の収縮が細胞外 Ca^{2+} の流入による $[Ca^{2+}]_i$ の増加に依存すること，また，ベタネコールによるムスカリン受容体刺激の際は，①細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出，②収縮系の Ca^{2+} 感受性増大の二つの機序が働き，さらに収縮の持続の維持には③細胞外 Ca^{2+} の流入も関与していることなどが推察された。

2．気管支平滑筋に対するハロセンの収縮作用について

ハロセンが気道の拡張作用を有することはよく知られており，臨床的にもその作用は確立している[10]。吸入麻酔薬は中枢性の抑制作用を有し[10]，気道に対する作用も主に中枢から迷走神経遠心路にかけての抑制作用により気道拡張が起こる[4]と考えられている。その他，吸入麻酔薬の気道拡張作用については，特に *in vivo* での研究が続けられ，β受容体への刺激作用[11]，systemicな反射抑制作用[12]，咳反射の抑制[13]，伸展受容器への作用[4]，アセチルコリンの分泌抑制[14]などの間接的な気道拡張作用が報告されている。一方，直接作用としてハロセンをはじめとする吸入麻酔薬は，種々の平滑筋の収縮に対し抑制的に作用するとの報告[6,9,34,35]が多い。しかし，収縮作用[4,5]や収縮と弛緩の二相性作用[29,36]などの報告もある。

今回の実験では，ハロセンは静止時の（静止張力をかけ安定させた）ブタ気管支平滑筋に対して濃度依存性の収縮作用を有することが認められた。また，その際，一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が認められ，そのpeak時の $[Ca^{2+}]_i$ の増加量もハロセン濃度依存性の傾向があることを示した。吸入麻酔薬が気管平滑筋の静止張力を高めることを明確に示したのはKogaら[5]の報告のみであり，気管支平滑筋における報告は著者の検索したかぎりではみあたらない。また，その収縮の際，$[Ca^{2+}]_i$ の上昇を明確に示した報告も見られない。また，ハロセンは Ca^{2+}-free PSS中においても，収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加を引き起こし，その大きさはnormal PSS中における値と比較して有意差はなかった。

以上のことより，ハロセン自体は直接作用としてブタ気管支平滑筋に濃度依存性の収縮作用を有し，その際の $[Ca^{2+}]_i$ の増加は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出に由来する[27]ことが強く示唆された。

気管平滑筋と同様に緊張性筋[8]である血管平滑筋においては，ハロセンがCICR機構を介して小胞体からの Ca^{2+} 放出を促し[29]，また，小胞体における Ca^{2+} の蓄積を抑制するとの報告[36]がある。平滑筋組織とは異なるが下垂体細胞ではハロセンがIICR機構を介して Ca^{2+} を放出させ細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の Ca^{2+} 貯蔵量を減少させる[37]ことが報告されている。骨格筋や心筋においてもハロセンのCICR亢進作用はよく知られている[38,39]。本実験の結果は，気管支平滑筋においてもこのような種々の組織と同様に細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を促すというハロセンの作用を示すものである。このことは，ハロセンなどの吸入麻酔薬が自律神経系を介して間接的な気道拡張作用を発揮する前に，気道に到達した吸入麻酔薬が気道平滑筋の緊張を高める可能性があることを示しており，臨床的には特に高濃度のハロセンを急激に吸入させることの危険性を示唆するものであろう。

3．気管支平滑筋収縮に対するハロセンの抑制作用について

刺激薬による気管平滑筋の収縮に対する吸入麻酔薬の作用については，これまでの報告[4－6]ではすべて抑制的に作用するとしているが，これらの報告は各種刺激薬によりいったん収縮した気管平滑筋に対する吸入麻酔薬の収縮緩解作用をみたものである。一方，著者は標本にハロセンを予め投与した状態での各種刺激薬の収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加量を測定し，ハロセンを負荷しない状態における同じ刺激薬による収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化とを比較検討することにより，ハロセンの収縮抑制作用を評価した。

本実験では，脱分極刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増加は，ハロセン負荷溶液中ではその両者ともハロセン濃度に依存性に低下した。その結果，ハロセンは脱分極刺激による平滑筋収縮の抑制作用を有し，その作用機序として $[Ca^{2+}]_i$ の増加抑制が認められた。また，前述した脱分極刺激の際の Ca^{2+} の由来から考えて，$[Ca^{2+}]_i$ の増加抑制は細胞外 Ca^{2+} の流入阻害によるものである可能性がある。ハロセンの細胞膜における Ca^{2+} チャネルに対する作用については，血管平滑筋においてハロセンがL-VDCを抑制することをBuljubasicら[18]がパッチクランプ法を用いて直接証明している。Yamakageら[40]は，イヌ気管平滑筋においてもハロセンの作用がL-VDCを介することを間接的に示している。

他方，ベタネコール刺激による平滑筋収縮に対しても，ハロセンは濃度依存性に収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の増加を抑制した。この結果はハロセンによる収縮抑制作用が $[Ca^{2+}]_i$ の抑制により生じることを示している。さらに Ca^{2+}-free PSS中においても同様の結果が観察された。この場合の $[Ca^{2+}]_i$ の抑制は先に投与したハロセンによる平滑筋の収縮によって細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位における Ca^{2+} が消費され，貯蔵部位内の Ca^{2+} 量がすでに減少していたことによる[27]ものと考えられる。逆に他家の報告[4－6]による受容体作動薬投与後のハロセンの効果が弛緩作用のみである理由として，受容体作動薬による平滑筋の収縮により細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の Ca^{2+} が枯渇して，ハロセンによる平滑筋の収縮が起こり得なかったとも考えられる。

一方，本実験の結果からベタネコールによる受容体刺激による張力および $[Ca^{2+}]_i$ に対するハロセンの抑制作用を比較すると，脱分極刺激に比べ，ベタネコール刺激ではハロセンが $[Ca^{2+}]_i$ の増加より収縮張力の増加をより顕著に抑制する傾向を示した。このことはハロセンが収縮抑制機序のひとつとして，受容体刺激による Ca^{2+} 感受性増加の抑制作用を有する可能性を間接的に示唆している[24]。また，本実験の結果から，ハロセン自体を気管支平滑筋収縮薬のひとつとしてとらえ，高カリウムあるいはベタネコール刺激と比較した場合，ハロセンではベタネコールと対照的に $[Ca^{2+}]_i$ の増加に比べ収縮張力の増加量が少ないことが観察された。このことはハロセンにより細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出による収縮が生じ，同時にハロセンによる何らかの Ca^{2+} 感受性低下機構が発現したとも推察される。

Ca^{2+} 感受性制御機構に対するハロセンの作用として，ハロセンが細胞膜に結合したPKC活性を低下させるとの報告[6]や，ハロセンによる細胞内cAMP濃度[34]あるいはcGMP濃度[35]の上昇，MLCホスファターゼの活性化[41]などの報告がある。しかし，平滑筋の収縮における Ca^{2+} 感受性制御機構は今なお不明な点が多く，その機構に対する吸入麻酔薬の作用も平滑筋の種類で異なり，一定の見解が得られていない。また，今回の実験は $[Ca^{2+}]_i$ の変化を手掛かりに検討しているため，ハロセンが Ca^{2+} 感受性低下を示す機序を特定することはできなかった。

しかし，本研究により刺激薬による気管支平滑筋収縮に対するハロセンの抑制作用機序として，$[Ca^{2+}]_i$ の増加抑制（細胞外 Ca^{2+} 流入抑制および細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の Ca^{2+} 量減少）とともに，Ca^{2+} 感受性低下作用のあることが示唆された。この気管支平滑筋の収縮に対するハロセンの抑制作用は，喘息患者の麻酔時における喘息発作誘発の予防効果や，バルビツレートによる急速導入時の吸入麻酔薬併用の効果など，ハロセンの臨床的な気道拡張作用の有用性を直接作用の面からも裏づけるものである。

今後は平滑筋収縮機構の詳細が解明されるとともに，吸入麻酔薬の平滑筋に対する作用，中でも Ca^{2+} の感受性制御機構における作用機序の詳細を明らかにすることが重要であると考える。

結　　語

蛍光カルシウム指示薬fura-2による $[Ca^{2+}]_i$ 変化と収縮張力を同時測定することにより，ブ

タ気管支平滑筋の収縮機構およびハロセンの影響について検討し以下の結論を得た。

1．脱分極刺激により $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力が増加した。また，Ca^{2+}-free PSS 中ではこれらの反応は欠如した。

2．ムスカリン受容体刺激により $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力の増加は認められたが，$[Ca^{2+}]_i$ の増加量に比べ収縮張力は著しく増大していた。Ca^{2+}-free PSS 中でも収縮張力，$[Ca^{2+}]_i$ の peak 時の値は normal PSS 中と有意差はなかった。

3．Ca^{2+}-free PSS 中でのムスカリン受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ と収縮張力はベタネコール投与中に減衰していくことが認められた。

4．ハロセンは濃度依存性に一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の増加を伴う収縮作用を示した。Ca^{2+}-free PSS 中でも $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力の増加量に有意差はなかった。

5．ハロセンは脱分極刺激および受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力の増加を濃度依存性に抑制したが，受容体刺激では $[Ca^{2+}]_i$ の増加が収縮張力の増加より顕著に抑制された。一方，Ca^{2+}-free PSS 中でも，ハロセンは受容体刺激による $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力の増加を normal PSS 中と同様に抑制した。

謝　　辞

稿を終えるにあたり，終始ご懇篤なるご指導，ご校閲を賜りました岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座城茂治教授に衷心より謝意を捧げます。また，統計処理に直接ご指導を賜りました教養部数学一戸孝七教授に深謝致します。本研究の遂行に際し，数々のご助言，ご協力をいただきました久慈昭慶講師はじめ歯学部歯科麻酔学講座医局員各位に厚く感謝致します。

本論文の要旨は，第20回日本歯科麻酔学会総会（1992年9月，東京），第19回岩手医科大学歯学会総会（1993年11月），第41回アメリカ歯科麻酔学会（1994年4月，ボストン）にて発表した。

本研究の一部は，文部省科学研究費補助金一般研究C課題番号03670955によって行われた。

文　　献

1）佐藤雅仁，丹羽均，久慈昭慶，鹿内理香，鹿内靖子，佐藤裕，上村信博，渋谷徹，城茂治：Sturge-Weber 症候群患者の麻酔経験，日歯麻誌，20：564－570，1992.

2）佐藤雅仁，久慈昭慶，杉村光隆，鹿内理香，佐藤裕，佐藤健一，野坂久美子，佐藤輝子，甘利英一，城茂治：3pトリソミー患者の全身麻酔経験，岩医大歯誌，18：120－125，1993.

3）佐藤雅仁，興梠精孝，久慈昭慶，鹿内理香，佐藤裕，佐藤健一，杉村光隆，城茂治：Rubinstein-Taybi 症候群患者の全身麻酔経験，日歯麻誌，22：693－694，1994.

4）古賀義久：麻酔薬ならびに麻酔補助薬の気道に及ぼす作用，麻酔，31：203－215，1982.

5）古賀義久，岩月尚文，佐藤大三，橋本保彦：イソフルレンの気管平滑筋に及ぼす直接作用－ハロセン，エンフルレンとの比較－，麻酔，36：1257－1263，1987.

6）Yamakage, M.: Direct inhibitory mechanisms of halothane on canine tracheal smooth mucle contraction. *Anesthesiology* 77：546－553, 1992.

7）上田一作：吸入麻酔薬にレセプタはあるか？麻酔，44：480－488，1995.

8）Golenhofen, K.: Theory of P and T systems for calcium activation in smooth muscle. Raven Press, New York, pp 197－202, 1976.

9）Mazzero, A. J., Cheng, E. Y., Stadnica, A., Bosnjak, Z. J., Coon, R. L., and Kampine, J. P.: Topographical differences in the direct effects of isoflurane on airway smooth muscle. *Anesth. Analg.* 78：948－954, 1994.

10）Wood, M., and Wood, A. A. J.: Drugs and Anesthesia pharmacology for anesthesiologists, 2nd. ed., Williams & Wilkins, Baltimore, pp 225－270, 1990.

11）Klide, A. M., and Aviado, D. M.: Mechanism for the reduction in pulmonary resistance induced by halothane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 158：28－35, 1967.

12）Hirshman, C. A., Edelstein, G., Peetz, S., Wayne, R., and Downes, H.: Mechanism of action of inhalational anesthesia on airways. *Anesthesiology* 56：107－111, 1982.

13）Carvert, J. R., Steinhaus, J. E., Lange, S. J., and Taylor, C. A.: Halothane as a depressant of cough reflex. *Anesth. Analg.* 45：76－81, 1965.

14）Korenaga, S., Takeda, K., and Ito, Y.: Differential effects of halothane on airway nerves and muscle. *Anesthesiology* 60：309－318, 1984.

15）Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260：3440－3450, 1985.

16）Nishimura, J., Kolber, M., and van Breemen, C.: Norepinephrine and GTP-γ-s increase myofilament Ca^{2+} sensitivity in α-toxin permiabilized arterial smooth muscle. *Biochem. Biophysres. Commun.* 157：677－683, 1988.

17）House, C., Wettenhall, R. E., H., and Kemp, B. E.: The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 262：772－777, 1987.

18）Buljubasic, N., Rusch, N. J., Marijic, J., Kampine, J. P., and Bosnjak, Z. J.: Effects of halothane and isoflurane on calcium and potassium channel currents in canine coronary arterial cells. *Anesthesiology* 76：990－998, 1992.

19）Mori, M., Yanagisawa, Y., and Taira, N.: Histamine increases vascular tone and intracellular and extracelullar calcium in porcine coronary arteries. *Japan J. Pharmacol.* 52：263－271, 1990.

20）奥村一成，宮城島俊雄，岡伸光，山本道雄：実験溶液中の吸入麻酔薬濃度の規定，麻酔，36：313－318，1987.

21）佐藤雅仁，久慈昭慶，鹿内理香，佐藤裕，坂本望，城茂治：ブタ気管支平滑筋の収縮および細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するカフェインの作用，岩医大歯誌，19：75－83，1994.

22）堀田健：筋の機能とカルシウムイオン，臨床麻酔，12：1205－1213，1988.

23）Itoh, T., Kubota, Y., and Kuriyama, H.: Effects of a phorbol ester on acetylcholine-induced Ca^{2+} mobilization and contraction in the porcine coronary artry. *J. Physiology* 397：401－419, 1988.

24）Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H., and Murakami, K.: Effects of sodium niotroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *European J. Pharmacol.* 156：259－266, 1988.

25）Bolton, T. B.: Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59：606－719, 1979.

26）Ozaki, H., Ohyama, T., Sato, K., and Karaki, H.: Ca^{2+}-dependent and independent mechanisms of sustained contraction in vascular smooth muscle of rat aorta. *Japan J. Pharmacol.* 52：509－513, 1990.

27）Sato. K., Ozaki, H., and Karaki, H.: Multiple effects of caffeine on contraction and cytosolic free Ca^{2+} levels in vascular smooth muscle of rat aorta. *Naunyn-Schimiedeb. Arch. Pharmacol.* 338：443－448, 1988.

28）Karaki, H., and Weiss, G. B.: Calcium release in smooth muscle. *Life Sciences* 42：111－122, 1988.

29）Tsuchida, H., Namba, H., Seki, S., Fujita, S., Tanaka, S., and Namiki, A.: Role of intracellular Ca^{2+} pools in the effects of halothane and isoflurane on vascular smooth muscle contraction. *Anesth. Analg.* 78：1067－76, 1994.

30）Gong, M. C., Fuglsang, A., Alessi, D., Kobayashi, S., Cohen, P., Somlyo, A. V., and Somlyo, A. P.: Arachidonic acid inhibits miosin light chain phosphatase and sensities smooth muscle calcium. *J. Biol. Chem.* 267：21492－21498, 1992.

31）Stull, T. J., Hsu, L.-C., Tansey, M. G., and Kamm, K. E.: Miosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 265：16683－16690, 1990.

32）Winder, S. J., and Walsh, M. P.: Smooth muscle calponin. *J. biol. Chem.* 265：10148－10155, 1990.

33）Kitazawa, T., Reardon, S., Ikebe, M., and Masuo, M.: Mechanisms of Ca^{2+} sensitizing effect of protein kinase C on smooth muscle. *Biophys. J.* 64：A 121, 1993.

34）Sprague, D. H., Yang, J. C., and Nagai, S. H.: Effects of ioflurane and halothane on contractility and the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate system in the rat aorta. *Anesthesiology* 40：162－167, 1974.

35）Eskinder, H., Hillard, C. J., Flynn, N., Bosnjak, Z. J., and Kampine, J. P.: Role of guanylate cyclase－cGMP systems in halothane-induced vasodilation in canine cerebral arteries. *Anesthesiology* 77：482－487, 1992.

36）Su, J. Y., and Zhang, C. C.: Intracellular mechanismus of halothane's effect on isolated aortic strips of rabbit. *Anesthesiology* 71：409－417, 1989.

37）Hossain, M. D., and Evers, A. S.: Volatile anesthetic-induced efflux of calcium from IP_3-gated stores in clonal (GH_3) pituitary cells. *Anethesiology* 80：1379－1389, 1994.

38）Frazer, M. J., and Lynch Ⅲ, C.: Halothane and isoflurane effects on Ca^{2+} fluxes of isolated myocardial sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 77：316－323, 1992.

39）Blanck, T. J. J., Peterson, C. V., Baroody, B., Tegazzin, V., and Lou, J.: Halothane, enflurane, and isoflurane stimurate calcium leakage from rabbit sarcoplasmic reticulum. *Anesthesiology* 76：813－821, 76：813－821, 1992.

40）山蔭道明，土田英昭，並木昭義：平滑筋に対する吸入麻酔薬の直接作用機序，麻酔，42：1578－1586，1993.

41）Tang, D. C., Stull, T. J., Kubota, Y.: Reguration of the Ca^{2+} dependence of smooth muscle contraction. *J. Biol. Chem.* 267：11839－11845, 1992.