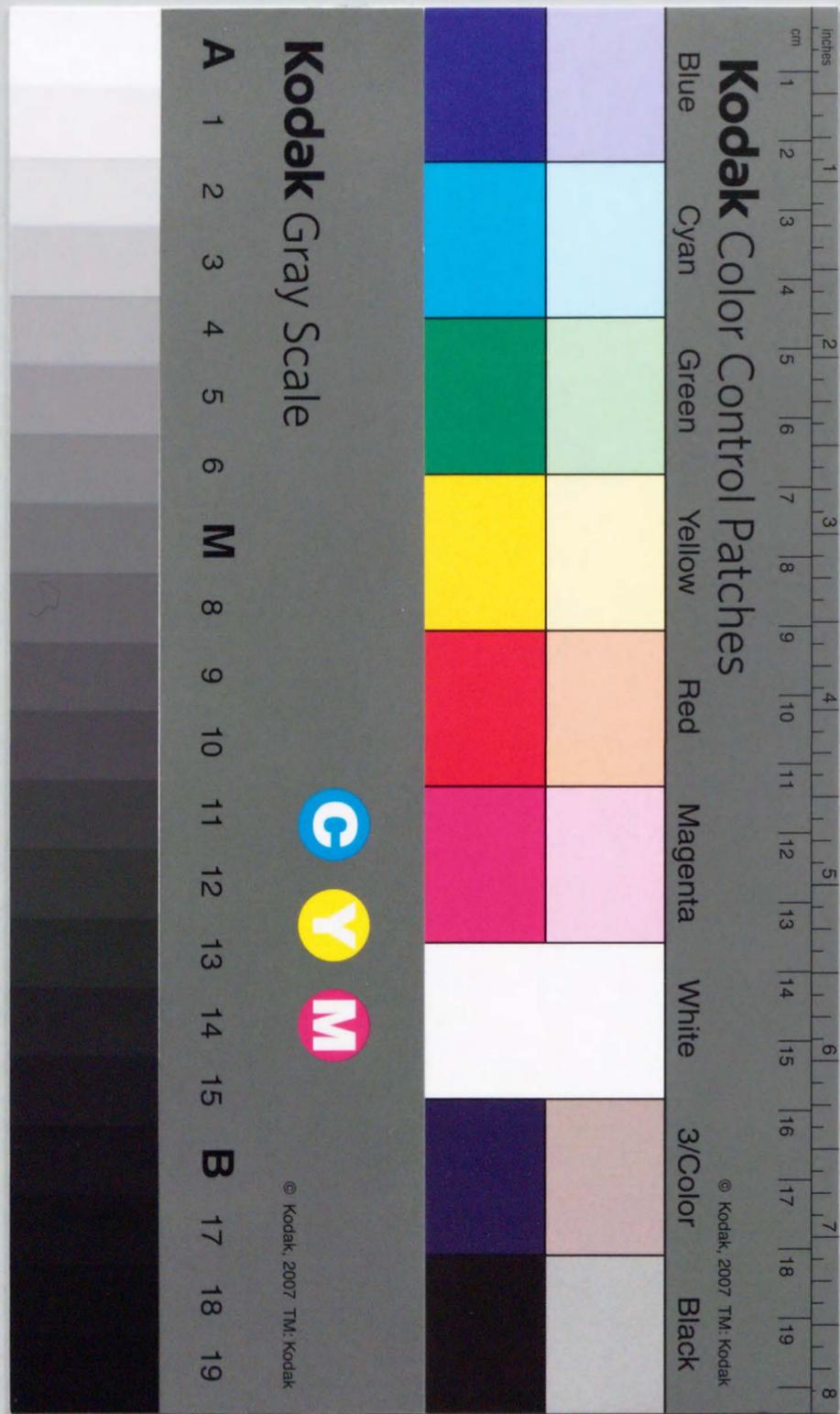


① 学位論文

エピネフリンが高血圧自然発症ラット大動脈平滑筋の収縮および細胞内  $Ca^{2+}$  動態に及ぼす影響

佐々木 寛成



## エピネフリンが高血圧自然発症ラット大動脈平滑筋の収縮および細胞内 $Ca^{2+}$ 動態に及ぼす影響

佐々木 寛成

岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座

(主任: 城 茂治 教授)

(受付: 1999年2月19日)

(受理: 1999年3月10日)

**Abstract:** Dental patients with essential hypertension treated with nonselective  $\beta$  adrenoceptor blocking agents may show a remarkable increase in blood pressure after administration of dental local anesthetics with 2% lidocaine containing 1/80000 epinephrine. The hemodynamic changes should occur as a net result due to interaction between epinephrine with  $\beta$  adrenoceptor blocking agents. The purpose of this study was to clarify the direct effects of the interaction on the aorta smooth muscle. I investigated the effects of epinephrine alone and the combination of epinephrine and nonselective  $\beta$  adrenoceptor blocking agents, propranolol, on isometric tension of spontaneously hypertensive rat (SHR) aorta smooth muscle and intracellular calcium level ( $[Ca^{2+}]_i$ ) by the fura-2/AM simultaneously, and compared with those of the normotensive Wistar Kyoto rat (WKY).

The results were obtained as follows:

- (1) In WKY, the increases in tension and  $[Ca^{2+}]_i$  induced by  $10^{-6}$  M epinephrine were less than those by 60 mM KCl.
- (2) In WKY, the tension induced by the combination of epinephrine and propranolol increased significantly more than that of epinephrine alone, but there were no differences between them in  $[Ca^{2+}]_i$ .
- (3) In SHR, the increases in tension induced by epinephrine were larger than that in WKY, but there were no differences between them in  $[Ca^{2+}]_i$ . By the combination of epinephrine and propranolol,  $[Ca^{2+}]_i$  was increased more than that of epinephrine alone, but tension was maintained at the same level of epinephrine alone.

In conclusion,

- (1) In rat aorta smooth muscle, the number of adrenoceptors may be reduced compared with other arterial smooth muscles.
- (2) In SHR aorta smooth muscle, the sensitivity of  $\alpha$  adrenoceptor may be increased, but increases in  $[Ca^{2+}]_i$  induced by activation of  $\alpha$  adrenoceptor with epinephrine may be controlled by an unknown mechanism, such as a buffer mechanism of sarcoplasmic reticulum (SR) against abrupt changes in  $[Ca^{2+}]_i$ .
- (3) Blocking  $\beta$  adrenoceptor increased only contraction but not  $[Ca^{2+}]_i$  in WKY, in SHR, however, it increased both of them. These results may suggest the impairment of the buffer mechanism of SR against changes in  $[Ca^{2+}]_i$ .

**Key words:** epinephrine, propranolol, contraction, intracellular calcium, spontaneously hypertensive rat (SHR)

Effects of Epinephrine on Contraction and Intracellular  $Ca^{2+}$  Mobilization in Aorta Smooth Muscle of Spontaneously Hypertensive Rats.

Hiroshige SASAKI

(Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020-8505 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 24: 36-45, 1999

## 緒 言

近年の高齢化, 医療の発達に伴い全身疾患を有する患者が歯科を受診する機会が多くなっている。とりわけ心血管系疾患, なかでも高血圧症を有する患者が増加している。このため, 高血圧症に対し  $\beta$  受容体遮断薬を服用している患者の受診も増加している。このような  $\beta$  受容体遮断薬を服用している患者では, エピネフリン投与により異常な血圧の上昇を引き起こす可能性がある<sup>1)</sup>とされているが, 歯科用局所麻酔薬には麻酔効果の延長や増強などを目的にエピネフリンが含有されており<sup>2,3)</sup>, その使用には注意が喚起されている<sup>1)</sup>。エピネフリンの心循環器系に対する作用については, 血中濃度変化による影響など詳細な報告<sup>4,5)</sup>が多い。しかし高血圧症患者および  $\beta$  受容体遮断薬服用高血圧症患者の血管平滑筋に対するエピネフリンの直接作用については未だ不明な点が多い。

一方, カルシウムイオン (以下  $Ca^{2+}$ ) 感受性蛍光指示薬の開発により収縮と共に血管平滑筋の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 (以下  $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化が同時に測定可能となり, 血管平滑筋においてもその収縮には細胞内  $Ca^{2+}$  動態が重要な役割を果たすことが報告されている。

そこで本研究では, 高血圧症の血管平滑筋に対するエピネフリンと  $\beta$  受容体遮断薬の相互作用を知ることを目的として, ヒトの本能性高血圧症の病態モデルとして広く用いられている雄性高血圧自然発症ラット<sup>6,7)</sup> (spontaneously hypertensive rat, 以下 SHR) の大動脈平滑筋を用いて収縮張力を測定し, 正常血圧の Wistar Kyoto ラット (以下 WKY) と比較検討した。また,  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を同時に測定し, その変化を手掛かりに相互作用の機序解明についても考察した。

## 材料および実験方法

### 1. 実験材料

16週齢の WKY と SHR (日本チャールス・リバー) をそれぞれ6個体用い, 1個体より数個の大動脈平滑筋標本を作製した。標本作製に先立ち, 各ラットについて体重と収縮期血圧を測定した。収縮期血圧測定にはラット尾動脈血圧記録装置 (PS-100, 理研開発社) を用いた。

### 2. 実験標本の作製

全てのラットについて頸動脈切断により屠殺し, 胸部大動脈を剖出し血管周囲の結合組織等を立体顕微鏡下に可及的に除去したのち, 内皮細胞を剥離し, 反転して直径2~3mm, 長さ3~4mmの血管平滑筋輪状標本を作製した。

### 3. $Ca^{2+}$ 感受性蛍光指示薬の負荷

続いて  $Ca^{2+}$  感受性蛍光指示薬 Fura-2 / AM (同仁科学) 40 $\mu$ M 0.01% Pluronic F-127 (BASF) を溶解した physiological salt solution (以下 normal PSS, pH7.4) に血管標本を入れ, 暗所, 恒温槽 (約37 $^{\circ}$ C) にて約3時間振盪した。Normal PSSの組成は, 136.8mM NaCl, 5.6mM KCl, 2.5mM  $CaCl_2$ , 1.0mM  $MgCl_2$ , 5.5mM glucose, 10.0mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid (HEPES, 同仁化学) とした。

### 4. 収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の基準値測定

Fura-2 / AM を負荷した各標本を細胞内  $Ca^{2+}$  測定装置 (CAF-230, 日本分光社) の恒温槽内 (容量 0.4ml) に設置し, 静止張力0.5g を負荷し, Normal PSS を約30分間灌流した。

続いて, すべての標本で, まず60mM KCl 溶液を約30分間灌流し, それによって生じた等尺性収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  の最大値をそれぞれの標本における基準値 (100%) とした。なお, 60mM KCl 溶液は, normal PSS の NaCl と KCl を等モル量置換して作成した<sup>8)</sup>。

収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  の同時測定方法は Mori ら<sup>8)</sup>, Sato ら<sup>9)</sup>, 佐藤ら<sup>10-12)</sup> の方法によった。すなわち収縮張力の測定については, 細胞内  $Ca^{2+}$  測定装置の恒温槽内で, 標本的一端を

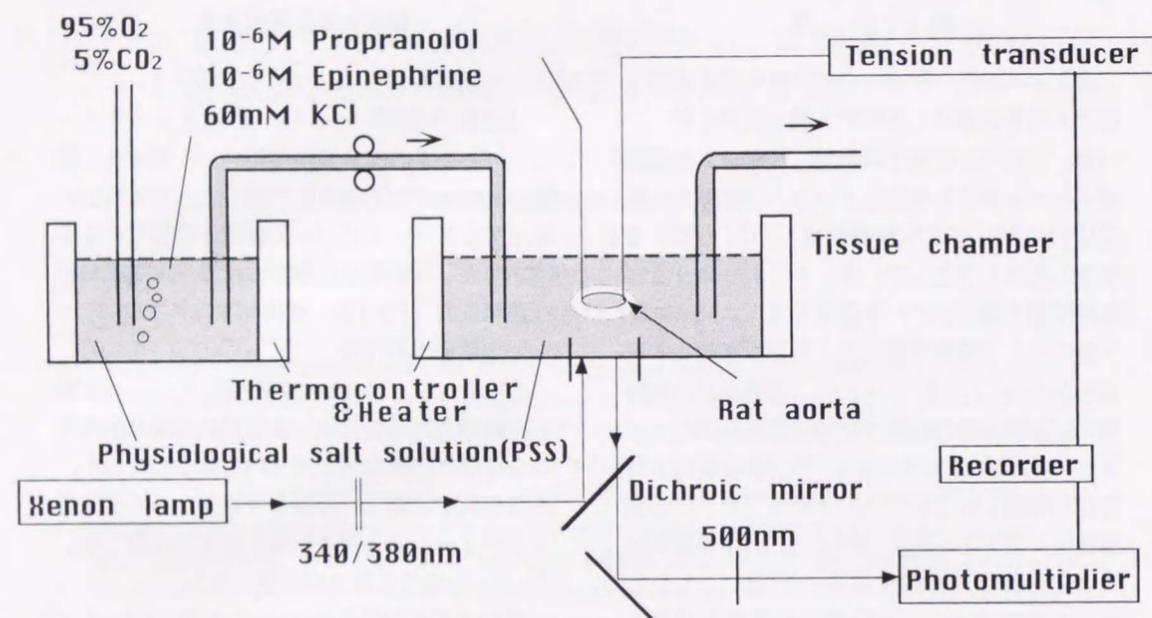


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

マニピレーター (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-2 GR, ミネベア) に固定して増幅ユニット (VC-11, 日本光電) を介してレコーダー (WR-7400, グラフテック) にて記録した。

一方,  $[Ca^{2+}]_i$  については, 細胞内  $Ca^{2+}$  測定装置内のキセノンランプから発する励起光を, 340nm と 380nm のバンドパスフィルタ付き回転盤を介して標本に照射することにより二波長励起を行った。これにより発する組織からの蛍光を 500nm のフィルタを介して光電子倍增管に導き, 340nm と 380nm 励起蛍光強度を測定し, その蛍光強度比 ( $R_{340/380}$ ) を求め,  $[Ca^{2+}]_i$  の指標とした<sup>8-12)</sup> (Fig.1)。

5. エピネフリン単独投与時の収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

WKY および SHR の各標本において基準値を得たのち, normal PSS で約30分間恒温槽内を灌流し, 等尺性収縮張力がほぼ60mM KCl 投与前値に復するのを確認した。その後  $10^{-6}$  M エ

ピネフリンを溶解した normal PSS を灌流した。その際に発生する等尺性収縮張力および蛍光強度比を同時測定記録し, 基準値100%に対する比率で比較検討した。

6. プロプラノロール投与中におけるエピネフリン投与時の収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

WKY および SHR の各標本において基準値を得たのち, normal PSS で恒温槽内を灌流し, 等尺性収縮張力がほぼ60mM KCl 投与前値に復するのを確認した。その後  $\beta$  受容体遮断薬として  $10^{-6}$  M プロプラノロール含有 normal PSS を約30分間灌流した。次に  $10^{-6}$  M プロプラノロールと  $10^{-6}$  M エピネフリンを含有した normal PSS を灌流した。その際に発生する等尺性収縮張力および二波長励起光照射によって得られた蛍光強度比を同時測定記録し, 基準値100%に対する比率で比較検討した。

7. 統計処理

統計処理には, WKY 群, SHR 群ともにそれぞれの値について正規性の検定, 異常データの検出 (廃棄検定), 等分散検定ののち, 平均値

Table 1. Systolic Blood Pressure and Body Weight of Rats

Strain	N	Weight (g)	Systolic blood pressure (mmHg)
WKY	6	323 ± 8	149 ± 12
SHR	6	319 ± 14	211 ± 13*

Data are represented as mean ± S. D.  
N, number of experiments.  
\*p < 0.01 compared with values on WKY.

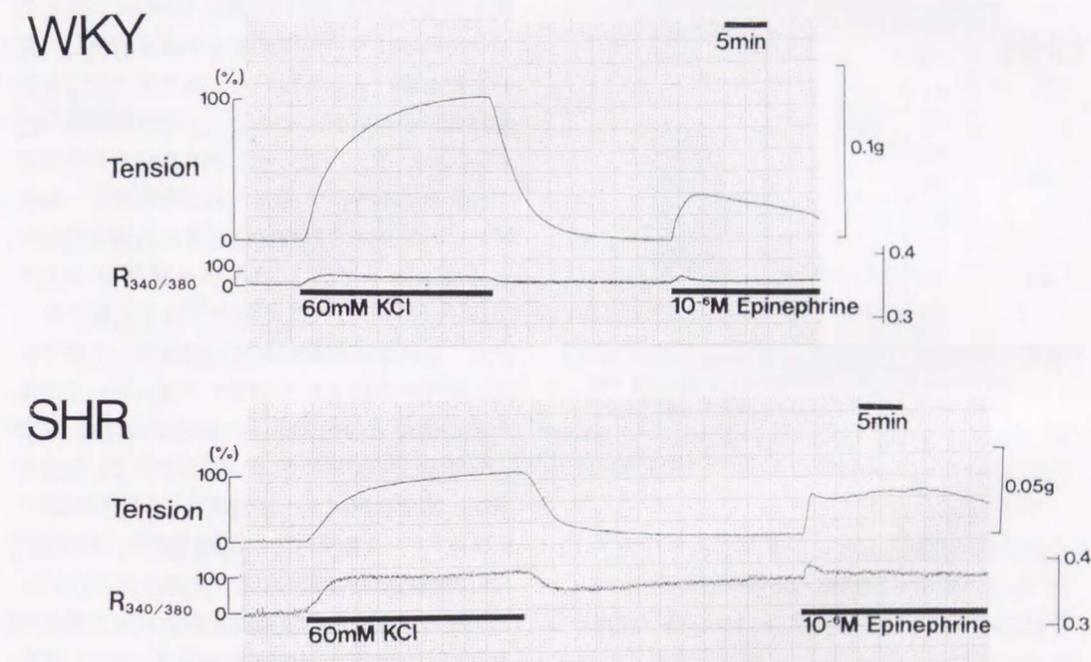


Fig. 2. Representative recordings of increases in tension and  $R_{340/380}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by  $10^{-6}$  M epinephrine on the aorta smooth muscles of WKY and SHR.

の有意差の検定 (t 検定) をおこない, 危険率 5% 未満を有意差有りとした。

## 結 果

### 1. WKY と SHR の体重および血圧

体重は WKY 群では  $323 \pm 8$  g, SHR 群では  $319 \pm 14$  g であり, 両群間に有意差がなかった。SHR の収縮期血圧 ( $211 \pm 13$  mmHg) は WKY の収縮期血圧 ( $149 \pm 12$  mmHg) に比べ有意に高かった (Table 1)。

### 2. エピネフリン単独投与時の収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化

WKY, SHR の大動脈平滑筋標本に  $10^{-6}$  M エピネフリン含有 normal PSS を灌流するといずれの群も初期相でのピークをもった  $[Ca^{2+}]_i$  の増加とともに収縮張力が発生した (Fig. 2)。

WKY では収縮張力は 60mM KCl 投与時 (基準値) の 45.2% 収縮し,  $[Ca^{2+}]_i$  は 50.5% まで増加した (Fig. 3 上段)。

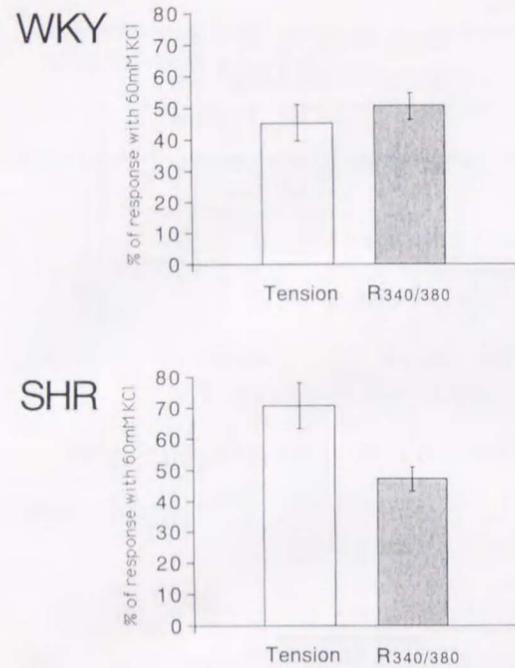


Fig. 3. Increases in tension and  $R_{340/380}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by  $10^{-6}$ M epinephrine on the aorta smooth muscles of WKY and SHR.  $N=9$  N, number of experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

一方, SHR では収縮張力は基準値の70.6%まで収縮したのに対し,  $[Ca^{2+}]_i$  は47.3%まで増加した (Fig.3下段)。

### 3. プロプラノロール投与中におけるエピネフリン投与時の収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化

$10^{-6}$ M プロプラノロールのみを含有する normal PSS 投与では, 収縮張力,  $[Ca^{2+}]_i$  はいずれも WKY, SHR 共に変化がなかった (Fig.4)。

WKY では  $10^{-6}$ M エピネフリンおよび  $10^{-6}$ M プロプラノロール含有 normal PSS の投与により収縮張力は基準値の68.3%まで増加し,  $10^{-6}$ M エピネフリン単独投与時に比べても有意に増加した。一方,  $[Ca^{2+}]_i$  は基準値の54.9%まで増加したものの  $10^{-6}$ M エピネフリン単独投与時と変化がみられなかった (Fig.5上段)。

SHR では収縮張力は基準値の69.9%まで増

加したものの,  $10^{-6}$ M エピネフリン単独投与時に比べると有意な変化はなかった。一方,  $[Ca^{2+}]_i$  は基準値の56.3%となり,  $10^{-6}$ M エピネフリン単独投与時に比べても有意に増加した (Fig.5下段)。

## 考 察

### 1. 実験材料について

本研究では, SHR および WKY の胸部大動脈を実験材料として用いた。SHR は WKY の中から高血圧を自然発症する系統を選択し, 兄妹交配を継代して得られたものであり<sup>6,7)</sup>, 本態性高血圧症の病態モデルとして現在最も広く用いられている。一方, ヒトでは高齢者の高血圧の90%は本態性高血圧症であるといわれ, 本実験により臨床での高血圧症患者の心循環器系に対するエピネフリンの影響を推察する上で SHR を用いることは適切であろうと考えた。また, 比較する対照正常血圧動物として完全に同じ祖先の系統である WKY を用いた。このような理由から心循環器系の研究には広く SHR と対象として WKY が用いられている。血管平滑筋に関する研究も小脳動脈<sup>13)</sup>, 腸間膜動脈<sup>14)</sup>, 尾動脈<sup>15,16)</sup>, 大動脈<sup>17,18)</sup>, 大腿動脈<sup>19,20)</sup>, 頸動脈<sup>21)</sup> など多岐にわたり報告されている。

一般に薬物の血管反応性をみるには大動脈のような太い血管 (conduit vessel) よりも筋性血管 (small muscular vessel) を用いたほうがより良いと考えられている<sup>22)</sup>。一方, 大動脈血管では小さな筋性血管に比べ細胞内筋小胞体が豊富であり, その収縮に細胞内筋小胞体からの  $Ca^{2+}$  放出が重要な役割を果たしているとの報告<sup>23)</sup>もあり, 本実験のように細胞内  $Ca^{2+}$  動態を同時に観察し, 収縮との関連を観察するには大動脈の方がより適していると思われる。しかし細胞内筋小胞体は収縮時の  $Ca^{2+}$  供給器官としての役割だけでなく,  $Ca^{2+}$  取り込み機能やフィードバック機序による細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を抑制し, 急激な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇を制限する調節器官でもある<sup>22)</sup>。このため大動脈での  $Ca^{2+}$  動態は複雑であるという欠点もある。

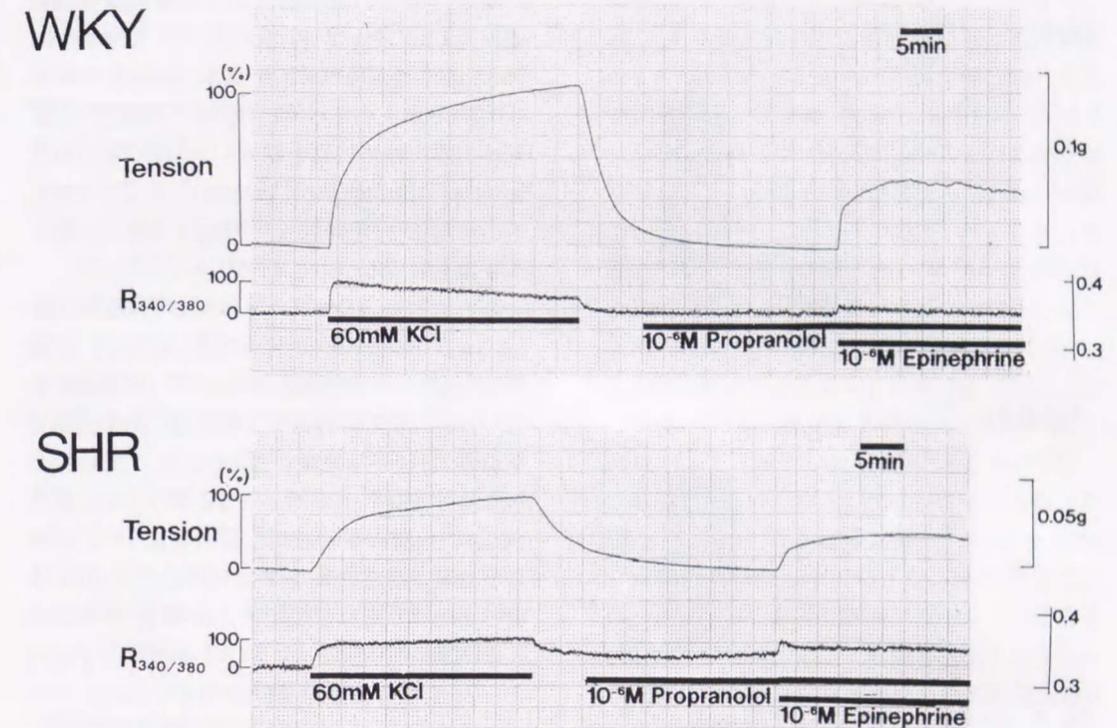


Fig. 4. Representative recordings of increases in tension and  $R_{340/380}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by  $10^{-6}$ M propranolol and  $10^{-6}$ M epinephrine on the aorta smooth muscles of WKY and SHR.

### 2. $[Ca^{2+}]_i$ の測定法について

骨格筋や心筋同様に血管平滑筋の収縮弛緩運動も  $[Ca^{2+}]_i$  により調節されていることは既に多くの報告<sup>24)</sup>が見られる。収縮や弛緩時の  $[Ca^{2+}]_i$  変化を測定する方法はいくつかある<sup>25)</sup>が, 1980年に Tsien らにより最初の  $Ca^{2+}$  感受性蛍光指示薬である Quin-2 が開発され<sup>26)</sup>, その後さらに改良された Fura-2 が開発された<sup>27)</sup>。これにより収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  を同時に測定することが可能になり, 平滑筋の収縮と細胞内  $Ca^{2+}$  との詳細な関連も徐々に明らかにされてきた。

本実験では蛍光指示薬として Fura-2 を用いたが, この Fura-2 による  $[Ca^{2+}]_i$  の絶対量の測定は, 蛍光強度比 ( $R_{340/380}$ ) および Fura-2 とカルシウムの解離定数を基に計算可能である<sup>17)</sup>。しかし, 細胞内での Fura-2 と蛋白質との結合状態など細胞内環境により解離定数が大

きく変化するため現時点では正確な解離定数を求めることは困難である<sup>28)</sup>。このため  $[Ca^{2+}]_i$  の増減の評価には絶対値が用いられることは少なく, 通常, 実験の開始時に各々の標本に高濃度 KCl を投与し, その際発生する蛍光強度比の変化を基準値 (100%) とし, これに対する相対的な蛍光強度比の変化量をもって評価されている。本実験においても, この方法に準じて各標本においてあらかじめ60mM KCl を投与して基準値を求めたあと, これに対する相対的な変化量をパーセンテージ評価し, 各実験群における  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を比較検討した。

### 3. エピネフリン単独投与時の収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化について

本実験ではエピネフリンの灌流濃度を  $10^{-6}$ M としたが, これは約  $2 \times 10^5$  pg/ml の濃度に匹敵する。この濃度はヒトにおいて (1/80000 エピネフリン含有) 2%リドカインカートリッジ

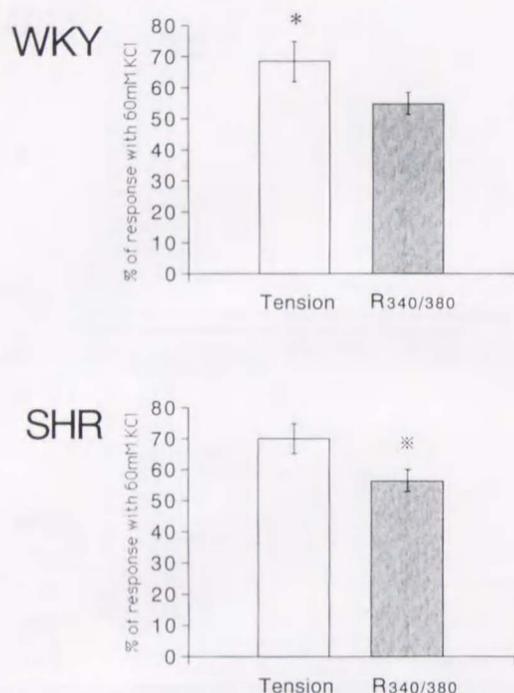


Fig. 5. Increases in tension and  $R_{340/380}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by  $10^{-6}$ M propranolol and  $10^{-6}$ M epinephrine on the aorta smooth muscles of WKY and SHR.

N = 9 N, number of experiments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  compared with values induced by  $10^{-6}$ M epinephrine on WKY. \*\* $p < 0.05$  compared with values induced by  $10^{-6}$ M epinephrine on SHR.

を用いて計40 $\mu$ gのエピネフリンを口腔粘膜内に投与した時にみられる最高血中濃度増加量である約200~600pg/ml<sup>5)</sup>に比べはるかに高濃度である。しかし、本実験では摘出血管を用いている、しかも平滑筋の収縮弛緩を多彩に修飾する内皮細胞を剥離してある、大動脈はアドレナリン作動性受容体が少ない、本実験系では微量の反応では測定が困難である、などの理由から高濃度エピネフリンを用いた。しかしエピネフリンは、その使用濃度により二相性の薬理作用すなわち低濃度では $\beta$ 作用が優位であるが高濃度になると $\alpha$ 作用が強くなるという報告<sup>3)</sup>もあり、その解釈には注意が必要となる。

高KClは脱分極刺激であり、細胞膜の電位依存性 $Ca^{2+}$ チャンネル (potential dependent channel: 以下PDC)を開いて細胞外から $Ca^{2+}$ を流入し、さらにこの $Ca^{2+}$ が細胞内貯蔵部位 (主に細胞内筋小胞体)からの $Ca^{2+}$ の放出 ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release: 以下CICR)を引き起こし、 $[Ca^{2+}]_i$ が増加することによって平滑筋の収縮が生じる<sup>29,30)</sup>。

これに対しエピネフリンによる平滑筋収縮は $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ アドレナリン受容体刺激による<sup>31)</sup>。 $\alpha_2$ 受容体刺激による収縮機序については不明な点が多いが、 $\alpha_1$ 受容体刺激では細胞膜にある受容体依存性 $Ca^{2+}$ チャンネル (receptor operated channel: 以下ROC)やPDCを介しての細胞外 $Ca^{2+}$ の流入を引き起こし<sup>32,33)</sup>、 $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる。さらに $\alpha_1$ 受容体刺激によりGTP依存性タンパクを介してホスホリパーゼC (以下PLC)が活性化され、ホスファチジルイノシトール-1,4,5-三リン酸 (以下 $IP_3$ )と1,2-ジアシルグリセロール (以下DG)が生成される。 $IP_3$ は細胞内筋小胞体からの $Ca^{2+}$ の放出 ( $IP_3$ -induced  $Ca^{2+}$  release: 以下IICR)を起こし<sup>32,34)</sup>  $[Ca^{2+}]_i$ を増加させる。またDGはプロテインキナーゼC (PKC)を活性化することにより収縮蛋白の $Ca^{2+}$ 感受性を増加させる<sup>35,36)</sup>。一方、エピネフリンには $\beta$ 作用もあり、エピネフリン投与は、 $\beta$ アドレナリン受容体の豊富な血管ではその受容体を介してアデニレートシクラーゼを活性化し、サイクリックAMP (以下cAMP)を増加させる。このcAMPの増加はミオシン軽鎖キナーゼをリン酸化し、ミオシンのリン酸化を抑制する<sup>37)</sup>ほか平滑筋細胞膜や細胞内筋小胞体の $Ca^{2+}$ ポンプに作用し $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制する<sup>36)</sup>。以上の結果、平滑筋が弛緩する。

本実験では、WKYにおいて $10^{-6}$ Mという高濃度エピネフリンにもかかわらず高濃度KClによる反応に対し45.2%の収縮と50.5%の $[Ca^{2+}]_i$ の増加しか得られなかった (Fig.3上段)。このことはラット大動脈ではエピネフリンに対し高カリウム刺激に比べ反応性が比較的

低いことを示唆しており、アドレナリン作動性受容体が大動脈では少ないとの報告<sup>19)</sup>に一致するものである。一方、SHRではエピネフリン単独投与により高濃度KClによる反応に対し70.6%の収縮と47.3%の $[Ca^{2+}]_i$ の増加が得られた (Fig.3下段)。すなわちWKYに比べて感受性 (収縮/ $[Ca^{2+}]_i$ )の増大がみられた。

SHRの血管平滑筋は、その部位、種類、週齢などによって多彩な特徴を呈する<sup>38,39)</sup>といわれている。例えばSHRの血管平滑筋は、WKYの血管に比べて、平滑筋膜のイオン透過性異常がみられる<sup>40)</sup>、ノルアドレナリンに対する反応性の増大とくに収縮性の増大がみられる<sup>39)</sup>、アドレナリン受容体の異常とくに $\beta$ 受容体数の減少と $\alpha_1$ 受容体数の増加がみられる<sup>40)</sup>、 $Ca^{2+}$ /カルモデュリン (CaM)系が亢進している<sup>40)</sup>、細胞内の遊離 $Ca^{2+}$ が増加して細胞内 $Ca^{2+}$ ストアーが減少している<sup>40)</sup>、細胞膜の流動性が変化して $Ca^{2+}$ の動態なども変化している<sup>41)</sup>、などさまざまな報告がされている。

以上の報告からSHRでの本実験結果の説明として、SHRでは $\alpha$ 感受性が増強された状態にあり、エピネフリンによる受容体刺激により、主としてPKC活性を介して収縮タンパクの $Ca^{2+}$ 感受性が増強され、収縮が増強されたと推察される。SHRでは細胞内 $Ca^{2+}$ が増加して細胞内ストアーが減少した状態にあるために $IP_3$ を介するIICRによる十分な $[Ca^{2+}]_i$ の増加が得られなかったとも推察される。SHRでは $\beta$ 作用が低下しているとの報告もあり<sup>42)</sup>、 $\beta$ 作用による細胞内筋小胞体への $Ca^{2+}$ 取り込みが阻害され、結果として非刺激状態においても細胞内のfree  $Ca^{2+}$ が増加した状態にあるとすれば今回の実験結果と一致することになる。

4. プロプラノロール投与中におけるエピネフリン投与時の収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の変化について

$\beta$ 受容体遮断薬とエピネフリン併用により血圧が上昇することが報告されている<sup>43)</sup>。

本実験では、WKYにおいて $\beta$ 受容体遮断薬併用時の収縮は非併用時に比べ増大したものの

$[Ca^{2+}]_i$ の増加はみられなかった (Fig.5上段)。すなわち $\beta$ 受容体遮断薬投与により細胞内 $Ca^{2+}$ に対する収縮蛋白の感受性の増大を示唆する結果となった。これは高濃度エピネフリンが投与され、かつ血管拡張作用のある $\beta$ 受容体が遮断されたため $\alpha$ 作用が優位に現われた結果である。ここで $[Ca^{2+}]_i$ の増加がみられなかった理由として、推測の域を脱しないが、細胞内筋小胞体が発達した大動脈平滑筋では細胞内筋小胞体の $[Ca^{2+}]_i$ 増加緩衝作用により $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が抑制されたとも考えられる。

一方、SHRにおいて $\beta$ 受容体遮断薬併用時にはWKYとは逆に非併用時に比べ $[Ca^{2+}]_i$ が増加したものの収縮の増大はみられなかった (Fig.5下段)。これは既に述べたとおりSHRでは非刺激時からすでに $\alpha$ 受容体の感受性亢進、 $\beta$ 受容体の感受性抑制がみられ、 $\beta$ 受容体遮断薬非投与群においても血管収縮性が高まった状態にあり十分な収縮がみられていたため $\beta$ 受容体遮断薬併用群との間に有為な収縮の増加がみられなかったものと思われる。一方、 $[Ca^{2+}]_i$ が $\beta$ 受容体遮断薬併用群で増加した理由として $\beta$ 作用によるcAMPを介する $[Ca^{2+}]_i$ の増加抑制効果が $\beta$ 受容体遮断薬によって排除されており $\alpha$ 作用による効果が現われたものと思われる。あるいはSHRではWKYでみられた細胞内筋小胞体の $[Ca^{2+}]_i$ 緩衝作用が障害されている可能性も否定できない。

いずれにしてもWKYでは $\beta$ 受容体遮断薬とエピネフリンを併用すると、併用しない時に比べ収縮が増大した。また、SHRではエピネフリン単独投与によっても $\beta$ 受容体遮断薬併用時と同程度の収縮が得られた。

## 結 論

以上の結果よりSHRおよびWKY大動脈のエピネフリン単独投与時及び $\beta$ 受容体遮断薬との併用時の収縮と $[Ca^{2+}]_i$ 変化について次の結論が導かれた。すなわち

1. ラット大動脈では、高KCl刺激に比べエピ

ネフリン投与による収縮,  $[Ca^{2+}]_i$  増加が小さく, アドレナリン作動性受容体が少ないことが示唆された。

2. SHR では  $\alpha$  作用に対する感受性が亢進している可能性があるが,  $\beta$  作用が抑制されている可能性も否定できなかった。

3.  $\beta$  受容体遮断薬により WKY では収縮蛋白の感受性が増大することが示唆された。また,  $\beta$  受容体遮断薬により SHR では  $\beta$  作用の  $[Ca^{2+}]_i$  増加抑制作用が遮断される可能性が示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり, 終始ご懇篤なる指導と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, 本研究の遂行に際し, ご協力いただきました久慈昭慶講師, 佐藤雅仁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いたします。

本研究の一部は第26回日本歯科麻酔学会総会(1998年9月, 長崎)にて発表した。

#### 参 考 文 献

- 金子 讓: 血管収縮薬, 古屋英毅, 松浦英夫, 雨宮義弘, 上田 裕, 金子 讓, 海野雅浩 編集: 歯科麻酔学, 第5版, 医歯薬出版, 東京, 182-196ページ, 1997.
- Meyer, R., and Allen, G. D.: Blood volume studies in oral surgery. *J. Oral. Surg.* 26: 721-726, 1968.
- 高井 宏: 歯科における局所麻酔, 歯界展望, 42: 725-730, 1973.
- 坂尻光春: ヒトにおける口腔内局所麻酔時の血中エピネフリン, ノルエピネフリン濃度と循環動態の変動に関する研究, 日歯麻誌, 15: 684-706, 1987.
- 金子 讓: 添加エピネフリンの血中濃度と循環, 日歯麻誌, 21: 1-14, 1993.
- Okamoto, K., and Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 27: 283-293, 1963.
- 岡本耕造: 実験的高血圧の研究, 日本内分泌学会誌, 38: 782-794, 1962.
- Mori, T., Yanagisawa, T., and Taira, N.: Histamine increases vascular tone and intracellular calcium level using both intracellular and extracellular calcium in porcine coronary arteries.

*Jpn. J. Pharmacol.* 52: 263-271, 1990.

- Sato, K., Ozaki, H., and Karaki, H.: Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle strips measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator Fura-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 294-300, 1988.
- 佐藤雅仁, 久慈昭慶, 鹿内理香, 佐藤 裕, 佐藤健一, 坂本 望, 城 茂治: プ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, 1995.
- 佐藤雅仁: プ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, 岩医大歯誌, 20: 299-311, 1995.
- 佐藤健一: プタ舌動脈平滑筋におけるアドレナリン収縮機序の検討, 日歯麻誌, 25: 398-409, 1997.
- Harder, D. R., Brann, L., and Halpern, W.: Altered membrane electrical properties of smooth muscle cells from small cerebral arteries of hypertensive rats. *Blood Vessels* 20: 154-160, 1983.
- Asano, M., Masuzawa-Ito, K. and Matsuda, T.: Charybdotoxin-sensitive  $K^+$  channels regulate the myogenic tone in the resting state of arteries from spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 108: 214-222, 1993.
- Hermesmeyer, K.: Cellular basis for increased sensitivity of vascular smooth muscle in spontaneously hypertensive rats. *Circ. Res.* 38(suppl 2): 53-57, 1976.
- Hermesmeyer, K.: Electrogenesis of increased norepinephrine sensitivity of arterial vascular muscle in hypertension. *Circ. Res.* 38: 362-367, 1976.
- Sada, T., Koike, K., Ikeda, M., Sato, K., Ozaki, H., and Karaki, H.: Cytosolic free calcium of aorta in hypertensive rats. *Hypertension.* 16: 245-251, 1990.
- Jelicks, L. A., and Gupta, R. K.: NMR measurement of cytosolic free calcium, free magnesium, and intracellular sodium in the aorta of the normal and spontaneously hypertensive rat. *J. Bio. Chem.* 265: 1394-1400, 1990.
- Asano, M., Aoki, K., and Matsuda, T.: Contractile effects of Bay K 8644, a dihydropyridine calcium agonist, on isolated femoral arteries from spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 239: 198-205, 1986.
- Aoki, K., and Asano, M.: Effects of Bay K 8644 and nifedipine on femoral arteries of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 88: 221-230, 1986.
- Asano, M., Masuzawa-Ito, K., Matsuda, T., Imazumi, Y., Watanabe, M., and Ito, K.: Functional role of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in resting state of carotid arteries from SHR. *Am. J. Physiol.* 265: 843-851, 1993.

- Ashida, T., Schaeffer, J., Goldman, W. F., Wade, J. B., and Blaustein, M. P.: Role of sarcoplasmic reticulum in arterial contraction: Comparison of ryanodine's effect in a conduit and a muscular artery. *Circ. Res.* 62: 854-863, 1988.
- 島 広樹: ラットにおける血管反応性の heterogeneity, 血管, 17: 65-75, 1994.
- 並河 徹: 血管平滑筋細胞における  $Ca^{2+}$  代謝, 血管, 8: 105-109, 1985.
- 田坂賢二: 細胞内カルシウムマーカー, 呼吸, 8: 161-167, 1989.
- Tsien, R. Y., Pozzan, T., and Rink, T. J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytosolic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescence indicator. *J. Cell. Biol.* 94: 325-334, 1982.
- Grynkiewicz, G., and Tsien, R. Y.: A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260: 3440-3450, 1985.
- Konisi, M., Olson, A., Hollingworth, S., and Baylor, S. M.: Myoplasmic binding of fura-2 investigated by steady-state fluorescence and absorbance measurements. *Biophys. J.* 54: 1089-1104, 1988.
- Yamakage, M.: Direct inhibitory mechanisms of halothane on canine tracheal smooth muscle contraction. *Anesthesiology* 77: 546-553, 1992.
- Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H., and Murakami, K.: Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 156: 259-266, 1988.
- 辻本豪三: 加齢に伴う血管平滑筋運動性の変化, *Mebio*, 9: 22-29, 1992.
- Karaki, H., and Weiss, G. B.: Calcium release in smooth muscle. *Life sciences* 49: 111-122, 1998.
- 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. *Jpn. J. Pharmacol.* 52: 509-512, 1990.
- 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338: 443-448, 1988.
- 飯野正光: 細胞内  $Ca^{2+}$  放出機構研究の新局面, 生体の科学, 44: 192-197, 1993.
- 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, 生体の科学, 44: 198-205, 1993.
- Meisheri, D., and Breemen, C., V.: Effects of  $\beta$ -adrenergic stimulation on calcium movements in rabbit aortic smooth muscle: Relationship with cyclic AMP. *J. Physiol.* 331: 429-441, 1982.
- 砂野 哲, 島村圭一: 高血圧自然発症ラットにおけるアドレナリン性神経筋興奮伝達-正常ラットとの比較, 血管, 11: 73-87, 1988.
- 家森幸男: SHR と本態性高血圧症, 高血圧, 2: 101-105, 1980.
- Masuyama, Y.: The neural and vascular factors in the pathogenesis of hypertension, 高血圧, 11: 133-151, 1989.
- Jones, A. W.: Altered ion transport in large and small arteries from spontaneously hypertensive rats and the influence of calcium. *Circ. Res.* 34, 35 (Suppl 1): 117-122, 1974.
- Limas, C. J., and Limas, C.: Decreased number of beta-adrenergic receptors in hypertensive vessels. *Biochim. Biophys. Acta*, 582: 533-536, 1979.
- 金 容善: 高血圧自然発症ラットの循環動態におよぼす連続投与の  $\beta$  遮断薬とリドカインに添加されたエピネフリンとの相互作用, 阪大歯学雑誌, 40: 384-393, 1995.

