

## ウシ中大脳動脈平滑筋の収縮と細胞内カルシウムイオン濃度変化に対するミダゾラムの影響

柏崎 泰

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12月27日)

(受理：2000年1月5日)

**Abstract** : The purpose of this study was to clarify the effects and mechanisms of midazolam on changes in contraction of the smooth muscle induced by a voltage dependent  $Ca^{2+}$  channel stimulator, 50mM KCl, and receptor activated  $Ca^{2+}$  channel agonist, serotonin (5-HT), in bovine middle cerebral arteries.

The isometric tension and intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) were measured simultaneously by the fura-2 microfluorometric methods, and I tried to deduce from their relationship the mechanism of midazolam on contraction.

The results obtained were as follows :

(1) KCl and 5-HT developed the degree of contraction and  $[Ca^{2+}]_i$  in a concentration-dependent manner.

(2) Midazolam depressed the degree of contraction and  $[Ca^{2+}]_i$  induced by KCl and 5-HT in a concentration-dependent manner.

(3) Midazolam had no effect on the tension/ $[Ca^{2+}]_i$  of KCl and 5-HT.

(4) Midazolam had no effect on transient increase of tension and  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 5-HT and caffeine in  $Ca^{2+}$ -free physiological salt solution ( $Ca^{2+}$ -free PSS).

(5) Flumazenil, a specific central-type antagonist of benzodiazepines, and PK-11195, a specific peripheral-type antagonist of benzodiazepines, had no effect on the depression of tension and  $[Ca^{2+}]_i$  by midazolam.

These results suggest the conclusion as follows,

Midazolam does not depress the contraction of bovine middle cerebral arteries induced by KCl and 5-HT in the manner of inhibition of  $Ca^{2+}$  release from sarcoplasmic reticulum and sensitivity of contractile elements to  $Ca^{2+}$  but does in the manner of inhibition of  $Ca^{2+}$  influx into smooth muscle cell from outside. Midazolam may not inhibit the contraction of smooth muscle through the central nor peripheral benzodiazepine receptors.

**Key words** ; bovine middle cerebral artery, midazolam, tension, intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, benzodiazepine receptor

---

Effects of midazolam on changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration and tension in bovine cerebral arteries

Yasushi KASHIWAZAKI

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University. 1-3-27 Chuo-dori, 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.* 25 : 59-69, 2000

## 緒 言

近年、高齢化が進むにつれて、脳血管障害を合併する患者が歯科を受診する機会が増加する傾向にあるが、このような患者は、歯科治療に対する不安やストレスなどによる血圧変動により脳血管障害が増悪し、重篤な結果を招く可能性がある。歯科治療中のこのような偶発症を防ぎ、円滑に歯科治療を行うために精神鎮静法が併用される。ベンゾジアゼピン系向精神薬であるミダゾラムは、静脈内投与時の血中半減期が約1.8時間と短く調節性が良いことから、外来における静脈内鎮静薬として現在もっとも広く用いられている。しかし、ミダゾラムが血管拡張作用を有するとの報告は多い<sup>1,2)</sup>が、脳血管平滑筋への直接作用は未だ不明な点が多い。

一般に平滑筋の収縮の程度は、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の変化で調節されると言われているが、 $[Ca^{2+}]_i$  と平滑筋張力の同時測定によりアゴニストでは張力 /  $[Ca^{2+}]_i$  比が増加することが示された<sup>3-5)</sup>。また、近年のスキンド法により  $[Ca^{2+}]_i$  が一定の状態においても、受容体とG蛋白質の活性化により、収縮蛋白の  $Ca^{2+}$  感受性が増加することが証明され、必ずしも収縮の程度は、 $[Ca^{2+}]_i$  の変化のみに依存するものではないことが明らかになりつつある<sup>3,6)</sup>。ミダゾラムを含むベンゾジアゼピン系薬剤の中樞神経系 (central nerve system ; CNS) への作用は中枢型ベンゾジアゼピン受容体 (central type benzodiazepine receptor ; CBR) を介して発現する<sup>7-9)</sup>。一方、CNS 以外の末梢組織にも末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (peripheral type benzodiazepine receptor ; PBR) が存在すると言われて<sup>10-13)</sup>いるが、ミダゾラムの血管平滑筋への直接作用が CBR および PBR を介するものかどうかは未だ明確でない。

そこで本研究では、ウシ中大脳動脈平滑筋を用いて、その収縮とその際の  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を手がかりに、ミダゾラムの脳血管平滑筋への作用とその機序について解明する目的で、(1)ミダ

ゾラムは脳動脈平滑筋の収縮、 $[Ca^{2+}]_i$  を抑制するか、(2)ミダゾラムは収縮装置の  $Ca^{2+}$  感受性を変化させるか、(3)CBR 拮抗薬あるいは PBR 拮抗薬は脳血管平滑筋に対するミダゾラムの作用に影響を及ぼすかについて検討した。

## 材料と方法

### 1. 標本作製

屠殺ウシの脳から中大脳動脈を摘出し、実体顕微鏡下で血管周囲の結合組織等を可及的に除去したのち、内皮細胞を機械的に剥離し、直径 1~2 mm、長さ 1~2 mm の血管平滑筋輪状標本を作製した。各実験において10標本ずつ用いた。

### 2. Fura-2 の負荷

physiological salt solution (normal PSS) に  $Ca^{2+}$  感受性蛍光指示薬として  $40\mu\text{M}$  Fura-2/AM (同仁科学) を溶解したものに標本を入れ、暗所、恒温槽内 (約  $37^\circ\text{C}$ ) にて約 3 時間振盪した。そのあと normal PSS で約 1 時間標本を洗浄し、細胞内の Fura-2/AM が Fura-2 に変わるのを待つとともに、細胞内外の Fura-2/AM を除去した。normal PSS の組成は、140mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM  $CaCl_2$ , 11.1 mM glucose, 3.0mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid (HEPES, 同仁科学) とした。

### 3. 測定方法

Fura-2/AM を負荷した標本を細胞内  $Ca^{2+}$  測定装置 (CAM-230, 日本分光) の恒温槽内に設置し、静止張力 1.0 g を負荷した状態で normal PSS を約 30 分間灌流した。収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  の同時測定は Mori ら<sup>14)</sup>、Sato ら<sup>15)</sup>、佐藤ら<sup>16)</sup>の方法によった。すなわち標本を細胞内  $Ca^{2+}$  測定装置の恒温槽内に、一端をマニピュレーター (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、収縮張力を測定し、増幅ユニット (VC-11, 日本光電) を介してレコーダー (FBR-253A, 東亜電波工業) に記録した。これと同時に  $[Ca^{2+}]_i$

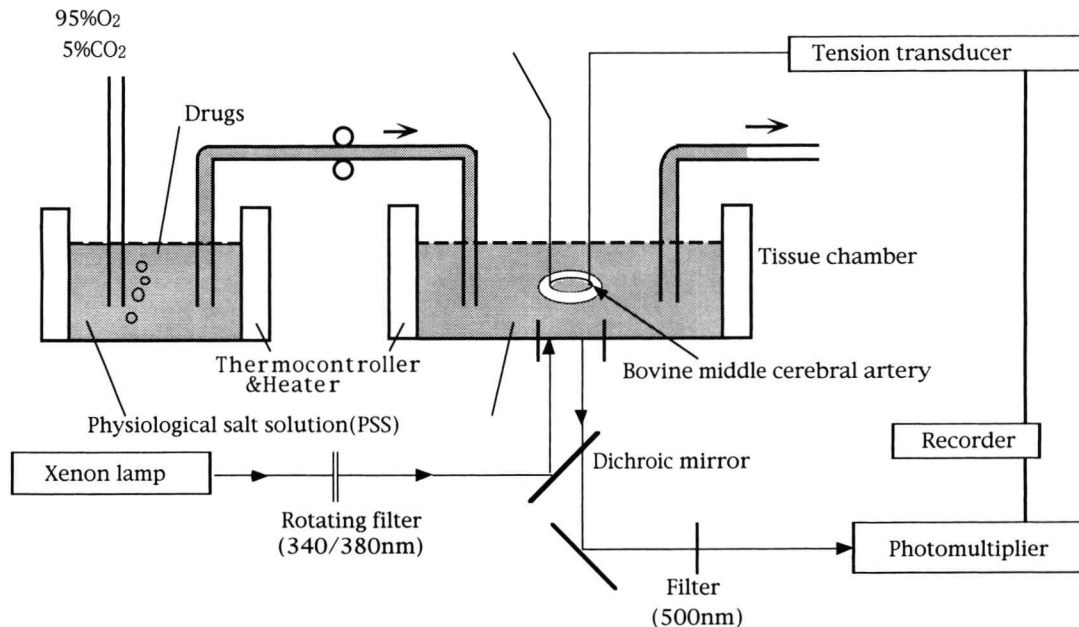


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental apparatus.

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 380 nm 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い、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>14-16)</sup> (Fig. 1)。

以下の順序で実験を行った。

1) 収縮張力および蛍光強度比の基準値の測定

実験の開始時に全ての標本に対して、まず 50 mM KCl 溶液を約 15 分間灌流し、それによって生じた等尺性収縮張力および蛍光強度比の最大変化値を測定し、それぞれの標本における基準値 (100%) とした。

2) 脱分極刺激薬 KCl による収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

基準値を測定後、15~20 分間 normal PSS を灌流し、等尺性収縮張力および蛍光強度比が 50 mM KCl 投与前値にほぼ復するのを待って、20mM KCl 溶液、90mM KCl 溶液を約 15 分間投与した。なお、20mM KCl, 50mM KCl, 90

mM KCl 溶液は、normal PSS の NaCl と KCl を等モル量置換して作製した。

3) ミダゾラムを投与した場合の 50mM KCl による収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

基準値を測定後、約 15~20 分間 normal PSS を灌流し、等尺性収縮張力および蛍光強度比が 50mM KCl 投与前値にほぼ復するのを待って、 $10^{-5}M$ ,  $10^{-4}M$ ,  $10^{-3}M$  の各濃度のミダゾラムの投与を開始し、約 5 分経過したのち 50mM KCl を約 15 分間投与した。(Fig. 2-A)。

4) 受容体刺激薬セロトニン (5-HT) による収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

基準値を測定後、normal PSS を約 15~20 分間灌流したのち、 $10^{-6}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-4}M$  の各濃度の 5-HT を約 15 分間投与した。

5) ミダゾラムを投与した場合の  $10^{-5}M$  5-HT による収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  の測定

基準値を測定後、normal PSS を約 15~20 分間灌流したのち、0,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-4}M$ ,  $10^{-3}M$  の各濃度のミダゾラムの投与を開始した。約 5 分経過したのち  $10^{-5}M$  5-HT を約 15 分間投与した。(Fig. 2-B)。

6) 細胞外液に  $Ca^{2+}$  が存在しない状態

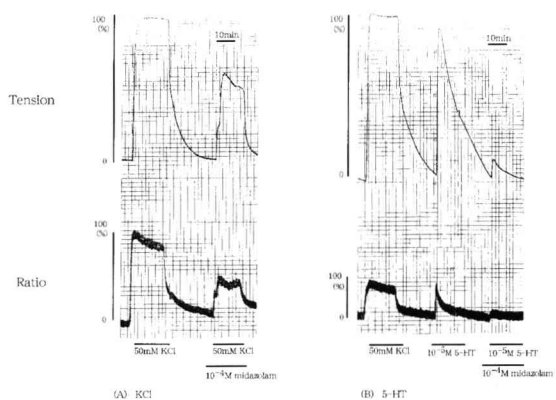


Fig. 2. Representative recordings of increases in tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) by KCl or 5-HT and inhibitory effect of midazolam on these responses.

A : Inhibitory effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction by 50mM KCl.

B : Inhibitory effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction  $10^{-5}M$  5-HT.

( $Ca^{2+}$ -free PSS) で、ミダゾラムがカフェインによる収縮張力と  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

基準値を測定後、normal PSS を約15~20分間灌流し、さらに  $Ca^{2+}$ -free PSS を灌流しつつ約5分後に20mM カフェインを約15分間投与した (Fig. 3-A)。これを本実験群のコントロールとした。次にコントロール群と同様に基準値測定後、normal PSS を灌流、 $Ca^{2+}$ -free PSS を灌流しつつ約5分後から  $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与し、さらに約5分後に20mM カフェインを投与した。(Fig. 3-B)。なお  $Ca^{2+}$ -free PSS の組成は、normal PSS の組成より2.5mM  $CaCl_2$  を除き、2.0mM 0,0-Bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol-N, N, N', N'-tetra acetic acid (EGTA, 同仁科学) を加えたものとした。

7) 細胞外液に  $Ca^{2+}$  が存在しない状態 ( $Ca^{2+}$ -free PSS) で、ミダゾラムが5-HTによる収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

基準値を測定後、normal PSS を約15~20分間灌流したのち、さらに  $Ca^{2+}$ -free PSS を灌流しつつ約5分後より  $10^{-5}M$  5-HT を約15分間投与した。これを本実験群のコントロールとした (Fig. 4-A)。次にコントロール群と同様に

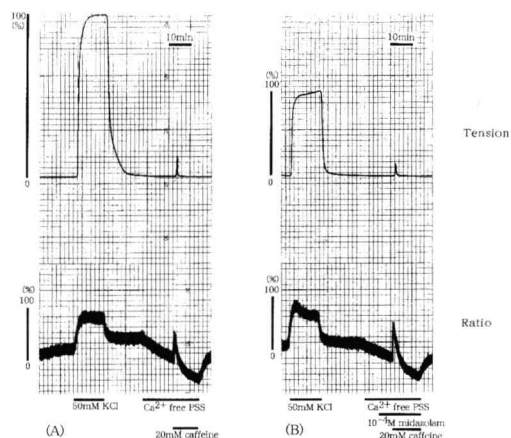


Fig. 3. Representative recordings of increases in tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) by caffeine and the effect of midazolam on these responses in  $Ca^{2+}$ -free PSS.

A : Increase in tension and fluorescence ratio induced by 20mM caffeine in  $Ca^{2+}$ -free PSS (control).

B : Effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction by 20mM caffeine in  $Ca^{2+}$ -free PSS.

基準値を測定後、normal PSS,  $Ca^{2+}$ -free PSS を約15~20分間ずつ灌流した。続いて  $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与しつつ約5分後に  $10^{-5}M$  5-HT を投与した。(Fig. 4-B)。

8) 中枢型ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬フルマゼニルがミダゾラム投与中における5-HTの収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

基準値を測定後、normal PSS を約15~20分間灌流したのち  $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与しつつ約5分後に  $10^{-5}M$  5-HT を投与した。これを本実験群のコントロールとした (Fig. 5-A)。次に、コントロール群と同様に基準値測定後、normal PSS を約15~20分間灌流し、 $10^{-5}M$  フルマゼニルおよび  $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与しつつ約5分後に  $10^{-5}M$  5-HT を投与した。(Fig. 5-B)。

9) 末梢型ベンゾジアゼピン受容体拮抗薬 PK-11195 がミダゾラム投与中における5-HTの収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

基準値を測定後、normal PSS を約15~20分間灌流したのち  $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与しつつ約5分後に  $10^{-5}M$  5-HT を投与した。これ

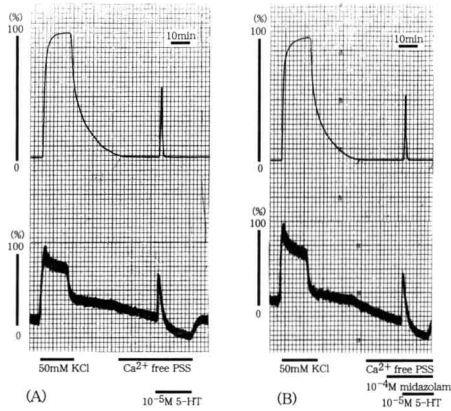


Fig. 4. Representative recordings of increases in tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) by 5-HT and effect of midazolam on these responses in  $Ca^{2+}$ -free PSS.  
 A : Increase in tension and fluorescence ratio induced by  $10^{-5}M$  5-HT in  $Ca^{2+}$ -free PSS (control).  
 B : Effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction by  $10^{-5}M$  5-HT in  $Ca^{2+}$ -free PSS.

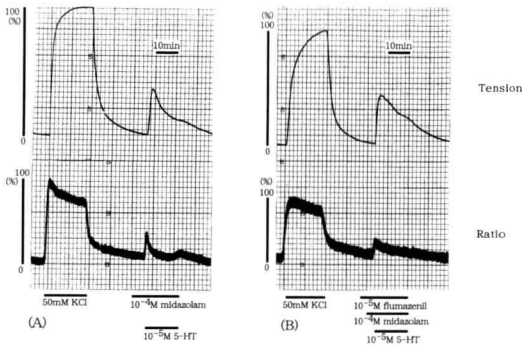


Fig. 5. Representative recordings showing the effect of midazolam on tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) development by 5-HT and effect of flumazenil on these responses.  
 A : Effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction by  $10^{-5}M$  5-HT (control).  
 B : Effect of treatment with  $10^{-5}M$  flumazenil on midazolam-induced decrease in tension and fluorescence ratio during contraction by  $10^{-5}M$  5-HT.

を本実験群のコントロールとした (Fig. 6-A)。次に、コントロール群と同様に基準値測定後、normal PSS を約15~20分間灌流し、 $10^{-5}M$  PK-11195および $10^{-4}M$  ミダゾラムを投与し

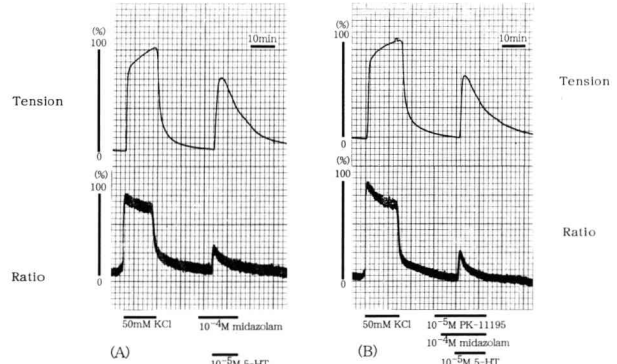


Fig. 6. Representative recordings showing the effect of midazolam on tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) development by 5-HT and effect of PK11195 on these responses.  
 A : Effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and fluorescence ratio during contraction by  $10^{-5}M$  5-HT (control).  
 B : Effect of treatment with  $10^{-5}M$  PK 11195 on midazolam-induced decrease in tension and fluorescence ratio during contraction by  $10^{-5}M$  5-HT.

つつ約5分後に $10^{-5}M$  5-HTを投与した。(Fig. 6-B)。

なお、すべての実験において、発生した等尺性収縮および蛍光強度比を同時測定し、基準値に対する%評価にて比較検討した。

#### 4. 統計処理

統計処理には、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、平均値の有意差の検定(t検定)を行い、危険率5%未満を有意差有りとした。

### 結 果

#### 1. KClおよび5-HTによる収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化

KCl投与により収縮張力、 $[Ca^{2+}]_i$ はともに急峻に増加し、やや漸減するものの投与中はほぼ一定の値であった。これに対し、5-HT投与により収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その後漸減した (Fig. 2)。KCl、5-HTはいずれも、収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ を濃度依存性に増加させた。また、収縮張力と蛍光強度

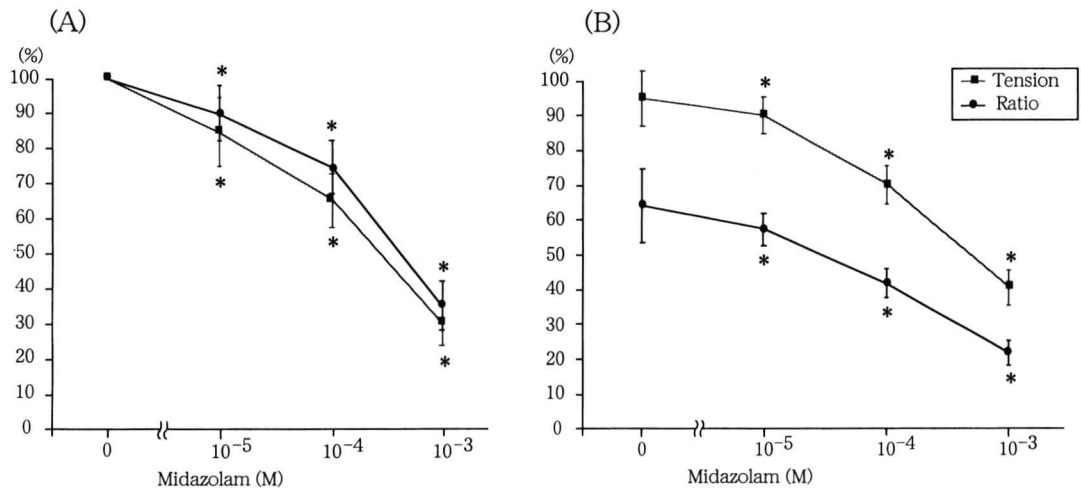


Fig. 8. Inhibitory effect of midazolam on tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by KCl and 5-HT.

Midazolam inhibited elevated tension and  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 50mM KCl (A) and 10<sup>-5</sup> M 5-HT (B) in a concentration-dependent manner.

Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

\*p < 0.05 compared with control.

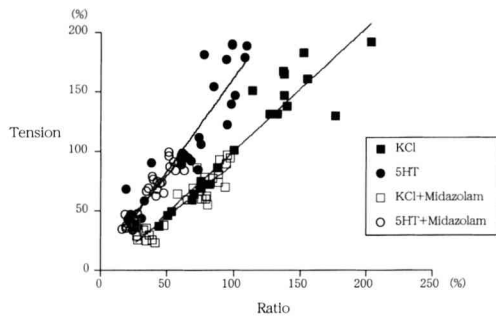


Fig. 7. Effect of midazolam on the tension- $[Ca^{2+}]_i$  relationship.

Regression line for the relationship between the tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by

KCl is :  $y = 1.03x - 3.92$  ;  $r = 0.93$

5-HT is :  $y = 1.57x + 4.19$  ;  $r = 0.92$

KCl+midazolam is :  $y = 0.88x + 1.37$  ;  $r = 0.92$

5-HT+midazolam is :  $y = 1.37x + 14.32$  ;  $r = 0.94$

比の関係をみると、5-HTによる収縮では、KCl刺激に比べ、収縮張力/ $[Ca^{2+}]_i$ が大きく、同じ $[Ca^{2+}]_i$ 変化量ではより大きな収縮張力が発生することが示された (Fig. 7)。

2. ミダゾラムがKClによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響

ミダゾラムは、濃度依存性に50mM KCl刺

激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化を有意に抑制した。(Fig. 8-A)。なお、各濃度のミダゾラムはnormal PSSで安定した標本の収縮張力、 $[Ca^{2+}]_i$ に影響を与えなかった。

3. ミダゾラムが5-HT刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化に及ぼす影響

ミダゾラムは、濃度依存性に10<sup>-5</sup> M 5-HT刺激による収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化を有意に抑制した。(Fig. 8-B)。

4. 細胞外液に $Ca^{2+}$ が存在しない( $Ca^{2+}$ -free PSS)状態で、ミダゾラムがカフェインによる収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化に及ぼす影響

$Ca^{2+}$ が細胞内貯蔵部位には存在するものの細胞外液に存在しない状態では20mMカフェイン投与により収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は一過性に増加し、その後は速やかに減少した (Fig. 3-A)。また、ミダゾラムは、このような $Ca^{2+}$ -free PSS中での20mMカフェインによる収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の変化に影響を与えなかった (Fig. 9-A)。なお、 $Ca^{2+}$ -free PSS灌流中でKCl溶液を投与した場合、収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ は変化しなかった。

5. 細胞外液に $Ca^{2+}$ が存在しない( $Ca^{2+}$ -free PSS)状態で、ミダゾラムが5-HTによる収縮

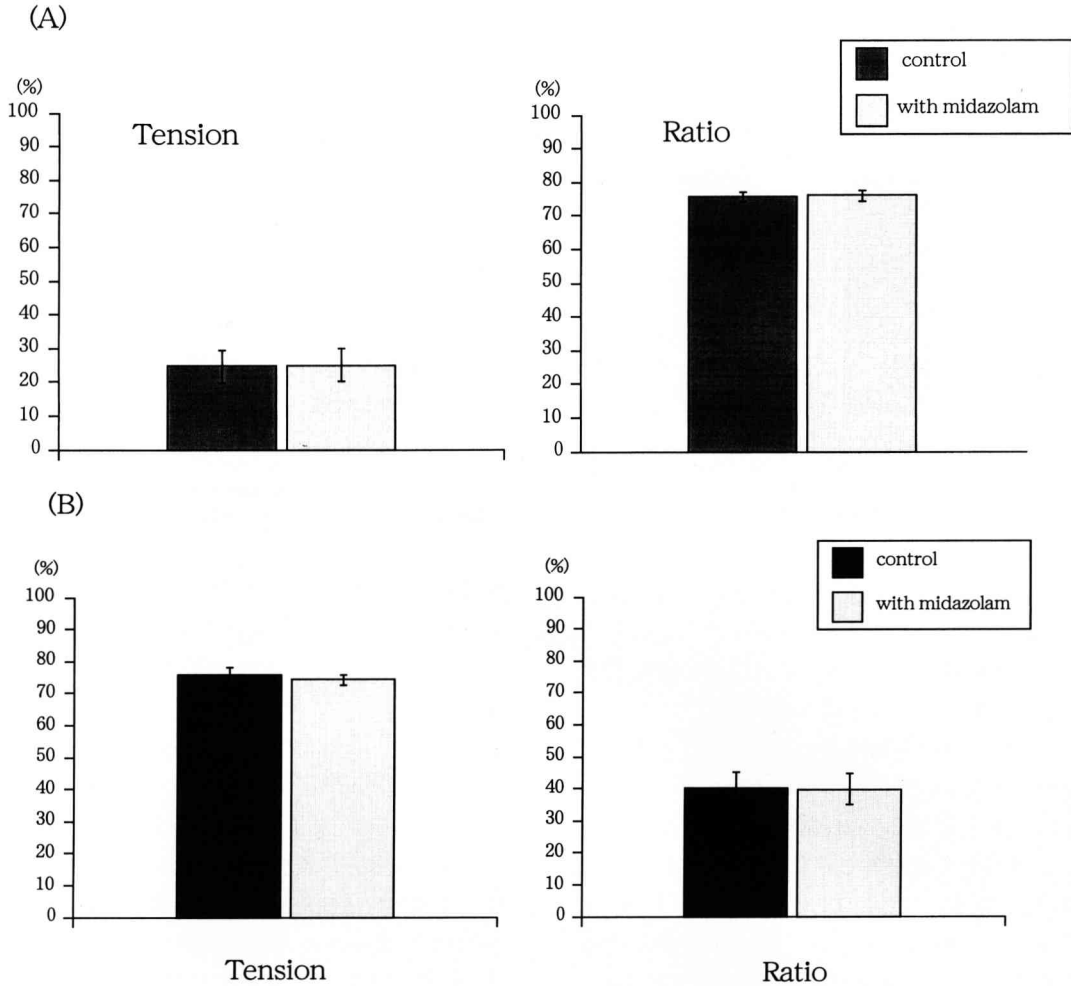


Fig. 9. Effect of midazolam on tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by caffeine and 5-HT in the absence of extracellular  $Ca^{2+}$ .  $10^{-4}$ M midazolam had no significant effect on the increase in tension and  $[Ca^{2+}]_i$  induced by 20mM caffeine (A) and  $10^{-5}$ M 5-HT (B). Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

張力と  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

$Ca^{2+}$  が細胞内貯蔵部位に存在するものの細胞外液に存在しない状態では、 $10^{-5}$ M 5-HT 投与により収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  は一過性に増加し、その後は速やかに減少した (Fig. 4 -A)。ミダゾラムは、このような  $Ca^{2+}$ -free PSS 中での  $10^{-5}$ M 5-HT による収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  の変化に影響を与えなかった (Fig. 9-B)。

6. フルマゼニルおよび PK-11195 がミダゾラム投与中における 5-HT の収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  変化に及ぼす影響

$10^{-5}$ M フルマゼニルおよび  $10^{-5}$ M PK-11195 はどちらも、ミダゾラム投与中の  $10^{-5}$ M 5-HT による収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  の変化に影響を与えなかった (Fig. 10)。

考 察

脳血管障害を合併する歯科患者に対し、歯科治療に起因する循環動態の変動を抑制する目的で、ミダゾラムが静脈内鎮静法に用いられる。しかし、脳血管平滑筋への直接作用および作用機序については不明な点が多い。そこで本実験では、脱分極刺激薬として KCl を、受容体刺激

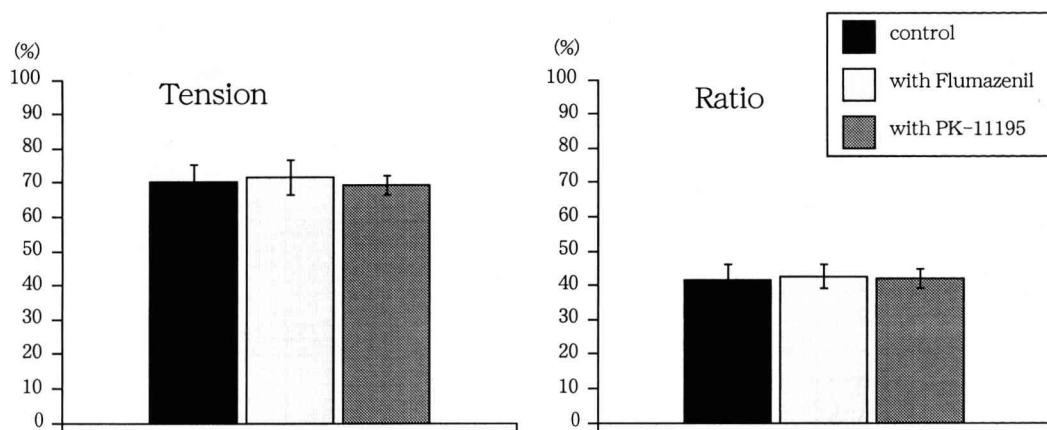


Fig. 10. Effect of flumazenil and PK11195 on the decrease in tension and fluorescence ratio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induced by midazolam.  $10^{-5}M$  Flumazenil and  $10^{-5}M$  PK11195 had no significant effect on the effect of  $10^{-4}M$  midazolam on tension and  $[Ca^{2+}]_i$  during contraction induced by  $10^{-5}M$  5-HT. Data are represented as mean  $\pm$  SEM.

薬として 5-HT を用いて脳動脈平滑筋の収縮に対するミダゾラムの直接作用を明らかにし、その作用機序についても  $[Ca^{2+}]_i$  の変化を手がかりに解明しようと試みた。

平滑筋の収縮機構において  $[Ca^{2+}]_i$  の増減が最も重要な因子となっているが、 $[Ca^{2+}]_i$  増加は、主として 2 つの経路を介して達成される。すなわち細胞外  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入と細胞内  $Ca^{2+}$  ストアである筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum ; SR) から細胞内への  $Ca^{2+}$  放出である。 $[Ca^{2+}]_i$  の増加は、 $Ca^{2+}$ -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、アクチンと反応し平滑筋の収縮が生じる<sup>6,17)</sup>。高  $KCl$  による収縮は、細胞膜の脱分極により電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル (voltage dependent  $Ca^{2+}$  channel ; VDCC) が開いて細胞外から  $Ca^{2+}$  が流入し、さらにこの  $Ca^{2+}$  が SR 上に存在するリアノジン受容体を活性化して、 $Ca^{2+}$  依存性の SR からの  $Ca^{2+}$  放出 ( $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release; CICR) を引き起こし、 $[Ca^{2+}]_i$  が増加することによって起こる<sup>18)</sup>。本実験においても、 $KCl$  による刺激により収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  が濃度依存性に増加する傾向を示した。また、 $Ca^{2+}$ -free PSS 中では  $KCl$  による刺

激では収縮張力および  $[Ca^{2+}]_i$  は変化しなかった。このことは、脳動脈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唆するものであり、他部位の平滑筋と同様の機序により収縮すると推察された。

一方、5-HT、アドレナリン、ヒスタミン、カルバコールなどの受容体刺激薬は、G 蛋白質共役型受容体を活性化することにより、受容体活性化  $Ca^{2+}$  チャンネル (receptor activated  $Ca^{2+}$  channel; RACC) を介しての細胞外  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入を引き起こし、 $[Ca^{2+}]_i$  を増加させるとされている<sup>19)</sup>。同時に、受容体刺激により G 蛋白質を介してホスホリパーゼ C (PLC) を活性化、ホスファチジルイノシトール-1, 4, 5-三リン酸 ( $IP_3$ ) が産生される。 $IP_3$  は細胞質を拡散して SR 上に存在する  $IP_3$  受容体を活性化して  $Ca^{2+}$  放出 ( $IP_3$  induced  $Ca^{2+}$  release; IICR) を引き起こし、 $[Ca^{2+}]_i$  を増加させる<sup>18)</sup>。また、増加した  $[Ca^{2+}]_i$  はリアノジン受容体を活性化させ CICR を引き起こすばかりでなく、活性化したリアノジン受容体は VDCC をも開くとの報告<sup>20)</sup>もあり、VDCC からの  $Ca^{2+}$  の流入によっても  $[Ca^{2+}]_i$  が増加する。さらに、平滑筋の収縮は、 $[Ca^{2+}]_i$  変化のみならず、収縮装置の  $Ca^{2+}$  感受性の変化に



よっても調節されている。受容体とG蛋白質が活性化されると、 $IP_3$  を介する経路を活性化するとともに、GTP結合型のRhoによるRho-kinase (RK) の活性化を介してMLCのリン酸化を増加させることによって、 $[Ca^{2+}]_i$  が一定でも張力が増加すると報告されている<sup>21)</sup>。本実験では、受容体刺激薬として5-HTを用いたが、5-HTによる刺激は収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  を濃度依存性に増加する傾向を示した。また、normal PSS中での5-HT刺激では、収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  は急激に増加し、その後緩やかに減少したのに対し、 $Ca^{2+}$ -free PSS中では5-HTの刺激で収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  は一過性に上昇した後、速やかに減少した。以上のことより初期の急峻な $[Ca^{2+}]_i$  の増加と収縮は $IP_3$  を介する経路の活性化により、SRからのIICRによって $[Ca^{2+}]_i$  が増加したことを示唆するものである。また、急峻な $[Ca^{2+}]_i$  の増加と収縮に続く持続相は細胞外からの $Ca^{2+}$  の流入が関与することを示唆するものである。さらに、5-HTとKClによる収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  の変化を、張力/ $[Ca^{2+}]_i$  比のグラフ (Fig. 7) において比較すると、5-HTのときは、回帰直線の傾きが大きい、すなわち $[Ca^{2+}]_i$  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。このことより、5-HTは収縮蛋白の $Ca^{2+}$  感受性を増加させたこととなり、GTP結合型のRhoによるRho-kinase (RK) の活性化を介してMLCのリン酸化を増加させたものと推測される。

本実験において、ミダゾラムはKClおよび5-HTによる収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  の増加を濃度依存性に抑制した。しかし、各濃度のミダゾラムは、それ自体normal PSS中で安定した標本の収縮張力、 $[Ca^{2+}]_i$  に影響を与えなかった。このことよりミダゾラムは脳動脈平滑筋における脱分極刺激および受容体刺激のどちらの収縮に対しても抑制作用があること、さらにミダゾラム単独では脳動脈平滑筋にはなんら作用がないことが示された。また、ミダゾラムの収縮抑制作用が収縮に先行する $[Ca^{2+}]_i$  の

増加をどの経路で抑制するのか、すなわち細胞外からの $Ca^{2+}$  流入およびSRからの $Ca^{2+}$  放出のどちらに作用しているのかを調べるために、 $Ca^{2+}$ -free PSS中でのカフェインおよび5-HTによる収縮に対するミダゾラムの影響について検討した。カフェインはSR上に存在するリアノジン受容体を活性化し、SRからのCICRを促進して収縮を発現する<sup>18)</sup>と考えられている。一方、5-HTはG蛋白質を介した $IP_3$  の産生によりIICRを促進して収縮を発現する。 $Ca^{2+}$ -free PSS中では、カフェイン、5-HTのどちらの収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$  の増加に対してもミダゾラムは影響を与えなかった。従ってこれらのことより、ミダゾラムはSRからのCICRやIICRには影響せず、細胞外からの $Ca^{2+}$  の流入を抑制することによって、 $[Ca^{2+}]_i$  増加を抑制することが示された。また、5-HTによる刺激はKClによる刺激に比して収縮蛋白の $Ca^{2+}$  感受性を増加させることが示唆されたが、Fig. 7の張力/ $[Ca^{2+}]_i$  比のグラフにおいて、KCl単独投与時とミダゾラムとKClを投与したときの回帰直線の傾きはほぼ一致していたこと、同様に5-HT単独投与時とミダゾラムに5-HTを投与した時の回帰直線の傾きもほぼ一致していたことより、ミダゾラムは $Ca^{2+}$  感受性には影響を与えないことが示唆された。

ミダゾラムの催眠、鎮静作用は、抑制性のGABAニューロンのシナプス後膜に存在するGABA<sub>A</sub>受容体と複合体をつくる中枢型ベンゾジアゼピン受容体 (CBR) にアゴニストとして高い親和性で結合し、GABA<sub>A</sub>受容体のGABA親和性を増大させることにより、GABAニューロンの作用を特異的に増強させることによるものといわれている<sup>7-9)</sup>。また、ミダゾラムは末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (PBR) にも特異的に結合するが、PBRは機能的、構造的にCBRとは異なり、さらにそれぞれの臓器によっても異なった作用を示す<sup>10-13)</sup>とされている。本実験では、さらにミダゾラムの血管平滑筋の収縮を抑制する機序に、CBRおよびPBR

が関与しているかどうかをCBR拮抗薬であるフルマゼニル<sup>22)</sup>およびPBR拮抗薬であるPK-11195<sup>23,24)</sup>を用いて検討した結果、いずれの拮抗薬もミダゾラムの5-HTによる収縮に対する抑制作用に影響を与えなかった。このことは、ミダゾラムがベンゾジアゼピン受容体を介さずに、Ca<sup>2+</sup>チャンネルを含む膜に直接作用して、細胞外からのCa<sup>2+</sup>の流入を抑制することにより[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>および収縮張力の増加を抑制することを強く示唆するものである。この結果は、気管平滑筋においてミダゾラムの収縮抑制作用に対してフルマゼニルおよびPK-11195が影響を与えなかったというKogaらの報告<sup>25)</sup>と一致するものであった。

本実験では、ウシの中大脳動脈の輪状血管標本を用いたが、本動脈は脳血管の様々な研究に用いられており<sup>26,27)</sup>、標本としても適切なものであったと思われるが、ヒトの脳動脈とは動態が当然異なるものと思われる。また、本実験では平滑筋の純粋な反応をみるために血管内皮細胞を剥離しているが、実際には血管内皮には血管の動態に大きく影響する様々な作用があり、複雑に影響するものと思われる。実際の臨床においては、鎮静状態が得られるミダゾラムの血中濃度は、100~400ng/ml、つまりおおよそ10<sup>-6</sup>M前後である<sup>28,29)</sup>が、本実験において10<sup>-5</sup>M、10<sup>-4</sup>M、10<sup>-3</sup>Mのミダゾラムにより脳動脈平滑筋の収縮が濃度依存性に抑制がみられたものの、十分かつ確実な抑制反応が得られたのは10<sup>-4</sup>Mであったため、10<sup>-4</sup>Mのミダゾラムを中心に実験した。ミダゾラムは血漿蛋白と高い親和性で結合する<sup>30)</sup>ことなども考慮すれば、臨床使用濃度と比して高濃度である。しかし、血管動態の増幅装置ともいわれる血管内皮細胞を剥離した輪状標本であることから10<sup>-4</sup>Mのミダゾラムもやむを得ないと考えた。このまま臨床と比較して議論するのは難しいが、脳血管平滑筋の収縮をミダゾラムが直接抑制することは確かであり、このことはミダゾラムによる静脈内鎮静法は脳血管障害を有する患者の歯科治療時では有利に作用すると思われる。

## 結 論

ウシ中大脳動脈平滑筋を用いて、血管平滑筋の収縮張力および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の変化を同時測定し、脳動脈平滑筋に対するミダゾラムの収縮抑制機序について検討し、以下の結論を得た。

1. ミダゾラムは、KClによる脱分極刺激、5-HTによる受容体刺激における収縮張力および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を、濃度依存性に抑制する。
2. ミダゾラムは、細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>の放出には影響せず、細胞外からのCa<sup>2+</sup>の流入を抑制する。
3. ミダゾラムは、ベンゾジアゼピン受容体を介さずに抑制する。
4. ミダゾラムは、収縮蛋白のCa<sup>2+</sup>感受性には影響しないことも示唆された。

## 謝 辞

稿をおえるにあたり、終始ご懇篤な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感謝申し上げます。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の医局員各位には厚く感謝の意を表します。

本研究の一部は第26回日本歯科麻酔学会総会(1998年、長崎)、第27回日本歯科麻酔学会総会(1999年、東京)にて発表した。

## 文 献

- 1) Brunner, F., Kuhberger, E., Groscher, K., Poch, G., and Kukovetz, W. R. : Characterization of muscarinic receptors mediating endothelium-dependent relaxation of bovine coronary artery. *Eur. J. Pharmacol.* 200 : 25-33, 1991.
- 2) Chang, K. S. K., Feng, M. G., and Davis, R. F. : Midazolam produces vasodilation by mixed endothelium-dependent and-independent mechanisms. *Anesth. Analg.* 78 : 710-717, 1994.
- 3) Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J., and Sato, K. : Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle.

- Pharmacol. Rev.* 49 : 157-230, 1997.
- 4) Morgan, J. P., and Morgan, K. G. : Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J. Physiol.* 351 : 155-167, 1984.
  - 5) Somlyo, A. P., and Himpens, B. : Cell calcium and its regulation in smooth muscle. *FASEB. J.* 3 : 2266-2276, 1989.
  - 6) Somlyo, A. P., and Somlyo, A. V. : Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372 : 231-236, 1994.
  - 7) Mohler, H., and Okada, T. : Benzodiazepine receptor : demonstration in the central nerve system. *Science* 198 : 849-851, 1977.
  - 8) Braestrup, C., and Squires, R. F. : High density of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature* 269 : 702-704, 1977.
  - 9) Squires, R. F., and Braestrup, C. : Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266 : 732-734, 1977.
  - 10) Anholt, R. R. H., Pedersen, P. L., De Souza, E. B., and Snyder, S. H. : The peripheral-type benzodiazepine receptor localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261 : 576-583, 1986.
  - 11) Braestrup, C., and Squires, R. F. : Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity [ $^3H$ ] diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. USA.* 74 : 3805-3809, 1977.
  - 12) Schoemaker, H., Boles, R. G., Dale Horst, W., and Yamaura, H. I. : Specific high-affinity binding sites for [ $^3H$ ] Ro 5-4864 in rat brain and kidney. *J. Phar. Exp. Ther.* 225 : 61-69, 1983.
  - 13) Gavish, M., Katz, Y., Bar-Ami, S., and Weizman, R. : Biochemical, Physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* 58 : 1589-1601, 1992.
  - 14) Mori, T., Yanagisawa, Y., and Taira, N. : Histamine increases vascular tone and intracellular calcium level using both intracellular and extracellular calcium in porcine coronary arteries. *Japan. J. Pharmacol.* 52 : 263-271, 1990.
  - 15) 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.
  - 16) 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 : 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, 1995.
  - 17) Itoh, T., Kubota, Y., and Kuriyama, H. : Effects of a phorbol ester on acetylcholin-induced  $Ca^{2+}$  mobilization and contraction in the porcine coronary artery. *J. Physiology.* 397 : 401-419, 1988.
  - 18) van Breemen, C., and Saida, K. : Cellular mechanisms regulating  $[Ca^{2+}]_i$  smooth muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 51 : 315-329, 1989.
  - 19) Karaki, H., and Weiss, G. B. : Calcium release in smooth muscle. *Life Sci* 42 : 111-122, 1988.
  - 20) 加藤邦夫, 加藤宏司, 御子柴克彦 : 細胞内  $Ca^{2+}$  ホメオスタシスと電気生理学的測定, 蛋白質 核酸 酵素, 43 : 1561-1566, 1998.
  - 21) 轟池田奈津子, 最上紀美子, 大村昌人, 吉本裕紀, 松崎益徳, 岡 正朗, 小林 誠 : 平滑筋収縮装置の  $Ca^{2+}$  感受性を増加させる新規の細胞内情報伝達機構, 麻酔, 47 : 530-540, 1998.
  - 22) Jones, R. D. M., Iawson, A. D., Andrew, L. J., Gunawardene, W. M. S., and Bacon-Shone, J. : Antagonism of the hypnotic effect of midazolam in children : A randomized, double-blind study of placebo and flumazenil administered after midazolam-induced anaesthesia. *Br. J. Anaesth.* 66 : 660-666, 1991.
  - 23) Mestre, M., Carriot, T., Belin, C., Uzan, A., Renault, C., Dubroecq, M. C., Gueremy, C., and LeFur, G. : Electrophysiological and pharmacological evidence that peripheral type benzodiazepine receptors are coupled to Ca channels in the heart. *Life Sci.* 36 : 391-400, 1985.
  - 24) LeFur, G., Vaucher, N., Perrier, M. L., Flamier, A., Benavides, J., Renault, C., Dubroecq, M. C., Gueremy, C., and Uzan, A. : Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [ $^3H$ ] RO 5-4864 and [ $^3H$ ] PK-11195, by thermodynamic studies. *Life Sci.* 33 : 449-457, 1983.
  - 25) Koga, Y., Sato, S., Sodeyama, N., Takahashi, M., Kato, M., Iwatsuki, N., and Hashimoto, Y. : Comparison of the relaxant effects of diazepam, flunitrazepam and midazolam on airway smooth muscle. *Br. J. Anaesth.* 69 : 65-69, 1992.
  - 26) Miyagi, Y., Kobayashi, S., Nishimura, J., Fukui, M., and Kanaide, H. : Resting load regulates cytosolic calcium-force relationship of the contraction of bovine cerebrovascular smooth muscle. *J. Physiol* 484 : 123-137, 1995.
  - 27) 大和田雅信 : ウシ脳血管収縮に対する 2, 3-diphosphoglycerate の増強効果について, 岩手医誌, 45 : 335-349, 1993.
  - 28) 澄川耕二, 稲垣喜三, 吉矢生人, 福光一夫, 吉川清 : ミダゾラムの血清濃度と中枢抑制作用, 臨床麻酔, 14 : 1129-1131, 1990.
  - 29) Allonen, H., Ziegler, G., and Klotz, U. : Midazolam kinetics. *Clin Pharmacol. Ther.* 30 : 653-661, 1981.
  - 30) Moschitto, L. J., and Greenblatt, D. J. : Concentration-independent plasma protein binding of benzodiazepines. *J. Pharm. Pharmacol.* 35 : 179-180, 1983.