

原 著

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

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

〔受付: 1994年 8月 1日〕

〔受理: 1994年 9月 8日〕

岩手医科大学歯科麻酔学講座 (主任: 城 茂治教授)

Abstract : Clinically, methylxanthines are known to be potent bronchodilators. However, methylxanthines induce contraction for many types of smooth muscle. To clarify this inconsistency, we investigated the effects of caffeine on intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) and tension in porcine bronchial smooth muscle.

Porcine bronchial muscle rings were loaded with a Ca^{2+} indicator dye, Fura-2/AM. The light emission ratio (R340/380) of Fura-2 was recorded to estimate the change in $[Ca^{2+}]_i$, and the isometric tension was simultaneously measured with a force displacement transducer. At the beginning of each experiment, changes in muscle tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by 90mM KCl were recorded as control values (100%). Thereafter, tension and $[Ca^{2+}]_i$ were recorded under the following conditions: changes induced by histamine (10^{-6} ~ 10^{-4} M), by 90mM KCl or 0.1mM histamine in a Ca^{2+} -free medium, by 2.5mM caffeine, and by 90mM KCl and 0.1mM histamine in the presence of 2.5mM caffeine. Histamine (10^{-6} ~ 10^{-4} M) induced concentration-dependent increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$. In the Ca^{2+} -free medium, the increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by 90mM KCl were significantly reduced, but those induced by histamine were not. Caffeine itself caused transient increases in tension and $[Ca^{2+}]_i$. Caffeine suppressed the increases tension induced by histamine, but it did not suppress the increases $[Ca^{2+}]_i$ induced by histamine. Caffeine did not affect the increases tension and $[Ca^{2+}]_i$ induced by 90mM KCl. Our data suggest that the increases tension induced by histamine is mainly caused by the release of stored Ca^{2+} and that induced by high K^+ is dependent on extracellular Ca^{2+} . Caffeine induces contraction and increase in $[Ca^{2+}]_i$ in porcine bronchial muscle. However, caffeine suppresses the histamine-induced tension by inhibiting the histamine-induced augmentation of Ca^{2+} sensitivity of the contractile proteins.

Key words : caffeine, Fura-2, intracellular calcium, bronchial muscle

結 言

臨床的には、カフェイン、テオフィリン等のキサンチン誘導体が気管平滑筋の弛緩作用を有し、気道を拡張させることはよく知られてお

り、気管支喘息、気管支痙攣等の治療に頻用されている^{1,2)}。その作用機序は、phosphodiesterase 阻害による cAMP の増加等が示唆されている¹⁻³⁾ものの、いまだ十分に解明されていない。一方、高濃度のキサンチン誘導体は、直

Effects of Caffeine on Contraction and Intracellular Ca^{2+} in Porcine Bronchial Smooth Muscle.
Masahito SATO, Akiyosi KUJI, Rika SHIKANAI, Yu SATO, Ken-ichi SATO, Nozomu SAKAMOTO and Shigeharu JOH
(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. 19 : 75-83, 1994

接作用として血管平滑筋をはじめとする種々の平滑筋収縮を引き起こすともいわれている⁴⁻⁶⁾。この、一見背反するキサンチン誘導体の平滑筋に対する作用を明らかにする目的で、今回我々は、蛍光カルシウム指示薬 fura-2 を用いて、高濃度 KCl およびヒスタミンによる気管支平滑筋収縮張力と、その際の細胞内カルシウムイオン濃度 (以下 $[Ca^{2+}]_i$) 変化を同時測定し、さらにそれらに対するカフェインの効果について検討した。

材料と方法

1. 実験材料

屠殺ブタの摘出肺より気管、気管支を切除した後、軟骨組織を全周にわたり剝離除去し、直径 4~5 mm、長さ 6~7 mm の気管支平滑筋輪状標本を作製した。

次いで、50 μ l fura-2/AM (同仁化学研究所), 0.01% Pluronic F-127 (BASF) を溶解した Physiological Salt Solution (以下 PSS, pH7.4) 中で、3 時間、37°C 暗所にて処理し、作製した標本に fura-2/AM を負荷した。PSS の組成は、140mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM $CaCl_2$, 2.5mM $MgCl_2$, 11.1mM ブドウ糖, 3 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethane sulfonic acid (HEPES, 同仁化学研究所) とした。

2. 実験装置及び測定方法

1) 収縮張力の測定: fura-2/AM を負荷後、標本を蛍光カルシウムイオン測定装置 (CAF-100, 日本分光) 上の恒温槽内に、一端をマニピレーター (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-2GR, ミネベア) に固定した。輪状標本の張力をこのトランスデューサーにより等尺的に測定し、血圧用増幅ユニット (N4438, 日本電気三栄) を介してレコーダー (RT2108R, 日本電気三栄) にて記録した。

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、340nm と 380nm のフィルター付き回転板を通して交互に標本に照射することにより二波長励起を行い、それにより発する組織の蛍光を 500nm のフィルターを介して光電子増倍管でとらえ、340nm 及び 380nm 励起蛍光強度を測定し、さらにその二波長励起蛍光強度比 (F_{340}/F_{380}) を張力と共に同時測定記録した (Fig.1)。この蛍光強度比の変化を $[Ca^{2+}]_i$ 変化の指標とした。

3. 実験手順

静止張力を 1.0 g とし、標本を固定後、張力の安定を図り、また細胞内の fura-2/AM が fura-2 に変わるのを待つと共に細胞内外の fura-2/AM を洗浄除去する目的で PSS で恒温槽内を灌流しつつ約 1 時間放置した。

その後、すべての標本でまず KCl (90mM) を投与し、それにより発生した収縮張力及び蛍光強度比の変化を同時測定記録し、以後の測定値に対する基準値 (100%) とした。その後以下の実験を行った。

1) ヒスタミン (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) を、各々標本に投与し、その際の張力および蛍光強度比を測定した。

2) 灌流液を Ca^{2+} を含まない溶液 (Ca^{2+} -free PSS, 組成: 140mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 11.1 mM ブドウ糖, 3 mM HEPES, 1mM EGTA) に交換後、各標本に、ヒスタミン (10^{-4} M), KCl (90mM) を投与し、それぞれの張力及び蛍光強度比を測定した。

3) カフェイン (2.5×10^{-3} M) を溶解した PSS を灌流し、その際の張力および蛍光強度比を測定した。ついでカフェイン存在下で、各標本に、ヒスタミン (10^{-4} M), KCl (90mM) を投与し、同様に張力及び蛍光強度比を測定した。

4. 統計学的処理

分散分析にて、正規性および等分散性を認め、Duncan New Multiple Range を用いて有意差検定を行った。

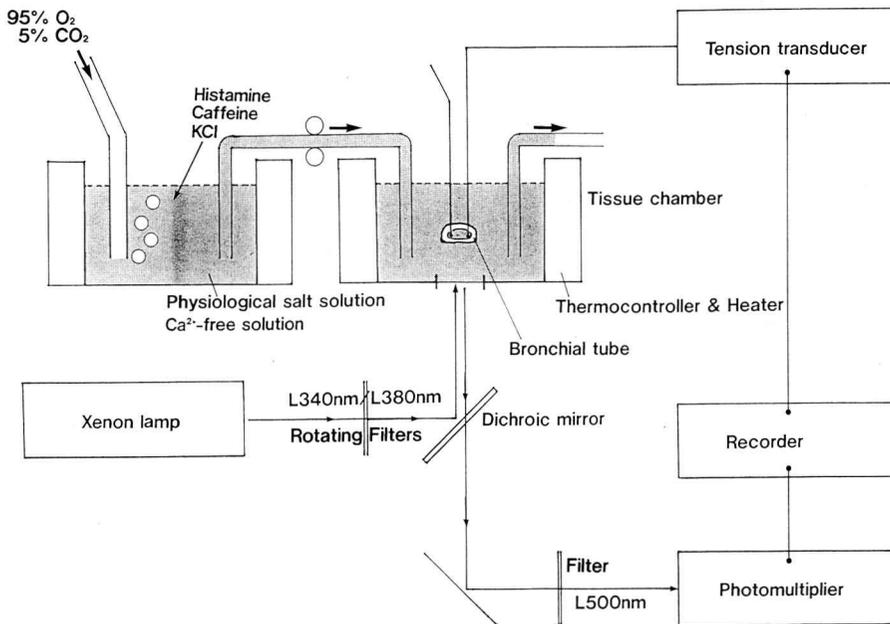


Fig.1 Schematic diagram of the experimental apparatus. The bronchial muscle tube (ring) was mounted on two tungsten hooks, one of which was glued to the arm of a force displacement transducer. Two wavelengths of excitation light (340nm and 380nm) were obtained from a xenon lamp source. Surface fluorescence of the tube was introduced through a 500nm band pass filter into a photomultiplier.

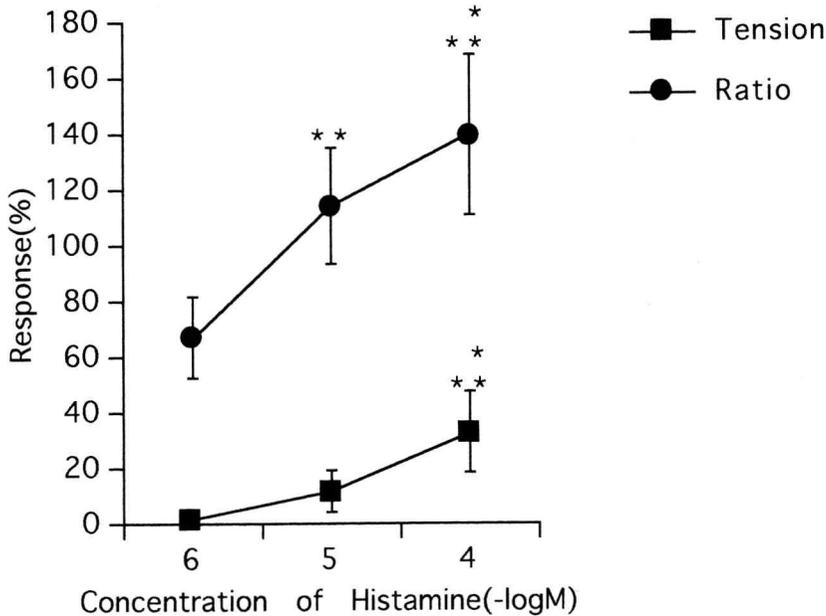


Fig.2 Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by various concentration of histamine. Histamine ($10^{-6} \sim 10^{-4}M$) induced concentration-dependent increase in tension and $[Ca^{2+}]_i$. Data are presented as mean \pm S.D.
 **p < 0.01 compared with values induced by histamine $10^{-6}M$.
 *p < 0.05 compared with values induced by histamine $10^{-5}M$.

実験結果

1. ヒスタミン (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} M) の効果
 ブタ気管支平滑筋においては, ヒスタミン投与により収縮張力が発生し, またそれにともない $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた。収縮張力と $[Ca^{2+}]_i$ の両者ともヒスタミン濃度依存性に増大した (Fig. 2, Table 1)。
2. 細胞外 Ca^{2+} 除去の影響
 細胞外 Ca^{2+} を除いた溶液中における, ヒスタミン刺激による張力と $[Ca^{2+}]_i$ 変化のピークには, 対照群との間に有意差を認めなかった (Fig. 3, Table 2)。一方, KCl 刺激により発生

した収縮張力は, 細胞外 Ca^{2+} を除去した場合, 基準値 (100%) に対して, 平均 16.3% と有意な減少を示した。その際の $[Ca^{2+}]_i$ も同様に平均 19.3% と著明に抑制された (Fig. 4, Table 2)。

3. カフェインの効果

カフェイン投与では, その直後より $[Ca^{2+}]_i$ および収縮張力の一過性の増加が認められた (Fig. 5, Table 2)。カフェイン存在下のヒスタミンによる収縮張力は, 対照 32.4% に対して, カフェイン投与中は 11.9% と有意に抑制された。しかし, その際の $[Ca^{2+}]_i$ の増加には有意差は認められなかった (Fig. 5, Table 2)。高濃度 KCl 投与では, 収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ 増加

Table 1 Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by histamine. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl which was performed at the beginning of each experiment.

Histamine (M)	Tension (%)	Ratio (%)	N ^b
10^{-6}	1.250 ± 1.013 ^a	66.717 ± 14.669	8
10^{-5}	11.075 ± 7.376 ^{**}	13.912 ± 21.156	8
10^{-4}	32.476 ± 14.404 ^{***}	139.31 ± 29.016 ^{***}	10

^aMean ± S. D.

^bNumber of bronchial muscle rings.

^{**}p<0.01 compared with histamine 10^{-6} M.

^{***}p<0.05 compared with histamine 10^{-5} M.

Table 2 Effects of various treatments on $[Ca^{2+}]_i$ and tension in porcine bronchial muscle. Values are expressed as % of each response to those induced by 90mM KCl.

Treatment	Tension (%)	Ratio (%)	N ^b
KCl, 90mM (control)	100	100	10
KCl, 90mM in Ca^{2+} -free PSS	16.331 ± 14.335 ^{**}	19.337 ± 11.663 [*]	8
KCl, 90mM under caffeine, 2.5mM	98.345 ± 32.574	85.088 ± 16.201	8
Histamine, 10^{-4} M (control)	32.476 ± 14.404	139.31 ± 29.016	10
Histamine, 10^{-4} M in Ca^{2+} -free PSS	32.389 ± 16.496	117.24 ± 47.776	6
Histamine, 10^{-4} M under caffeine, 2.5mM	11.867 ± 5.115	139.529 ± 19.945	7
Caffeine, 2.5mM	19.273 ± 10.8	21.52 ± 6.738	8

^aMean ± S. D.

^bNumber of bronchial muscle rings.

^{*}p<0.05 compared with control.

の両者ともカフェインの投与によってやや抑制される傾向を示したものの、基準値に対して有意差は認められなかった (Fig.5, Table 2)。

考 察

1. 細胞内カルシウムイオン濃度測定法について

種々の平滑筋の収縮・弛緩に際し、細胞内カルシウムイオンは重要な役割を担っているが、従来、平滑筋張力と同時に $[Ca^{2+}]_i$ を測定する

ことは非常に困難であった。しかし1980年以降、Grynkiewicz, Tsien⁷⁾により fura-2 に代表される蛍光カルシウム指示薬が開発され、平滑筋収縮の作用機序が明らかにされてきた。 $[Ca^{2+}]_i$ の絶対量は fura-2 による蛍光強度比および fura-2 と Ca の解離定数を基に計算されるが、近年、細胞内では fura-2 の大部分がタンパク質と結合し、Ca との解離定数が大幅に増加することが問題となった⁸⁾。

そのため、我々は実験の開始時に各々の標本

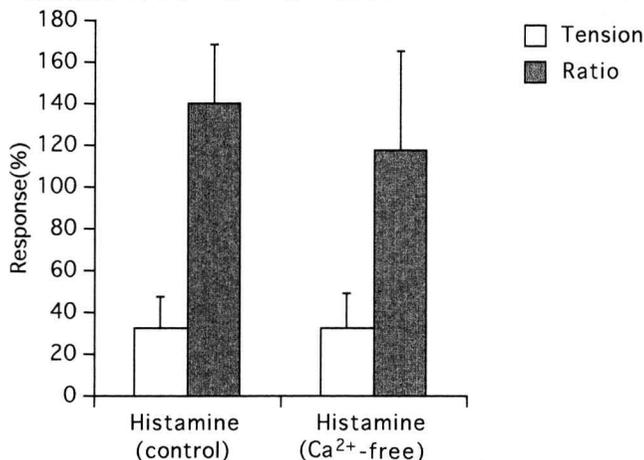


Fig.3 Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by histamine $10^{-4}M$ in Ca^{2+} -free PSS. In Ca^{2+} -free PSS, histamine produced similar increase in tension and $[Ca^{2+}]_i$ (ratio) compared with control. Ratio (R340/380) was recorded to estimate changes in $[Ca^{2+}]_i$. Data presented as mean + S. D.

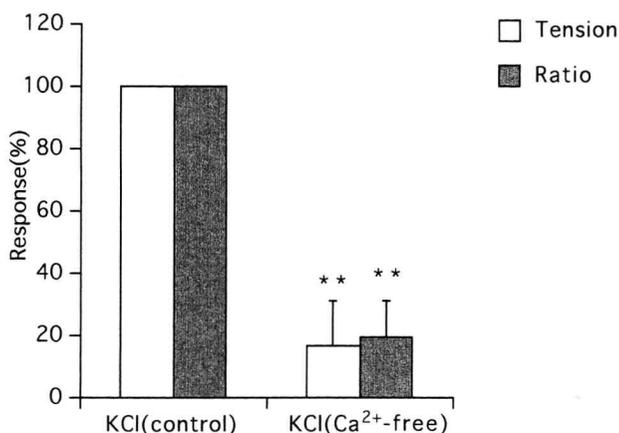


Fig.4 Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by 90mM KCl in Ca^{2+} -free PSS. In Ca^{2+} -free PSS, increase in tension and $[Ca^{2+}]_i$ were significantly reduced. Data presented as mean + S. D. ***p <0.01 compared with control values.

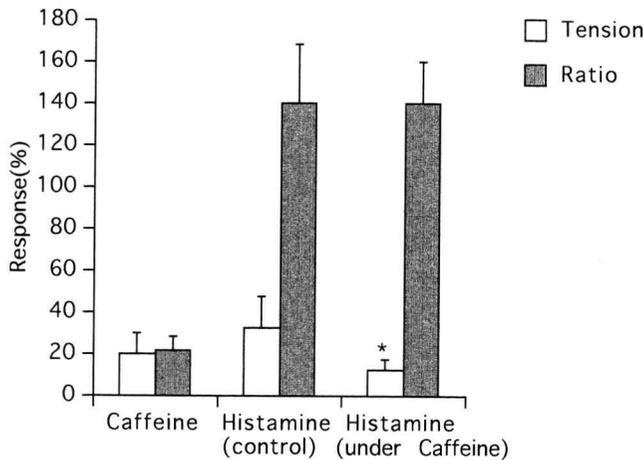


Fig. 5 Effects of caffeine on $[Ca^{2+}]_i$ and tension, and them induced by histamine. Caffeine caused increase in $[Ca^{2+}]_i$ and tension. Caffeine suppressed tension induced by histamine, but it did not affect $[Ca^{2+}]_i$ induced by histamine. Data presented as mean + S. D. *p < 0.05 compared with control values.

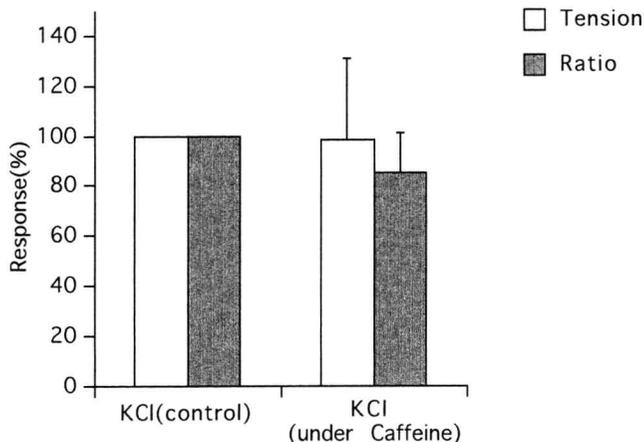


Fig. 6 Effects of caffeine on $[Ca^{2+}]_i$ and tension induced by 90mM KCl. No statistical significant.

に高濃度 KCl (90mM) を投与し、その際の蛍光強度比の変化を基準値 (100%) として、相対的な $[Ca^{2+}]_i$ の変化量を評価した。

2. 細胞外カルシウムイオン除去の影響について

高カリウム溶液を投与した場合、細胞膜の脱分極により細胞膜上の電位依存性カルシウムチャンネル (VOC: voltage-operated calcium channel) が開口し、細胞外 Ca^{2+} が流入し平滑筋収縮が引き起こされる⁹⁾。今回の結果で

も高カリウムの投与により収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ の増大が認められ、また、細胞外に Ca^{2+} がない場合にはその両者とも著明に抑制された。この結果により、気管支平滑筋においても、高カリウム投与時の収縮は細胞外からの Ca^{2+} 流入が主体となって惹き起こされることが確かめられた。

一方ヒスタミン刺激に伴う平滑筋収縮については、Mori ら⁶⁾が、ブタ冠動脈平滑筋のヒスタミンによる収縮に際し、細胞内貯蔵部位 (筋小

胞体など)からの細胞質内への Ca^{2+} 放出を収縮機構の一つに挙げながらも、細胞外からの Ca^{2+} 流入およびCキナーゼ活性化を介する収縮タンパクの Ca^{2+} 感受性増加をもう一つの収縮機構として挙げている。すなわち、ヒスタミンは H_1 受容体を介してホスファチジルイノシトールリン脂質(PI)代謝回転を引き起こし、イノシトール1,4,5三リン酸(IP_3)と1,2-ジアシルグリセロール(DAG)が生成されることが知られている¹⁰⁾。しかも IP_3 は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を促し(IP_3 -induced calcium release: IICR), DAGはCキナーゼを活性化することにより収縮タンパクの感受性を増加させる¹¹⁾。また、受容体刺激によりROC (recaptor operated channel)が活性化され細胞外から Ca^{2+} が流入されることも知られている。

今回の我々の結果では、ヒスタミン刺激の場合、細胞外 Ca^{2+} を除去してもその収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化のピークは対照に比較して有意差を認めなかった。このことから、ブタ気管支平滑筋においては、ヒスタミンによる収縮の際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加は、細胞外 Ca^{2+} の流入に由来するものは少なく、細胞内貯蔵部位からの細胞質内への Ca^{2+} 放出が大きく関与していることが間接的に示唆された。

3. カフェインの効果について

多くの平滑筋において、カフェインは細胞内貯蔵部位のカルシウムチャンネルを開口し Ca^{2+} を放出させ筋収縮を引き起こすことが知られている⁴⁻⁶⁾。しかしながら、カフェインは、臨床的に、気管支平滑筋においては弛緩作用を有し、気道を拡張させる。

今回の我々の結果では、他の種々の組織についての多くの報告と同様に、ブタ気管支平滑筋においてもカフェインは一過性の収縮を惹き起こし、その際同様に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増加を認めた。気管支平滑筋に対するカフェインの直接作用には種差があり、Chideckelら¹²⁾は、モルモット気管支平滑筋ではカフェインの投与により終始平滑筋の弛緩反応が得られたが、ヒト気管支平滑筋

は、特に高濃度カフェイン投与の際、一過性の収縮とそれに引き続く弛緩反応が見られたとし、またその一過性の収縮は小胞体などの細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出によると推論している。さらにSmallら¹³⁾はモルモット気管支平滑筋にキサンチン誘導体を投与した場合における収縮反応の欠如について細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出と同時に何らかの弛緩作用が生じるためとしている。いずれにせよカフェインによる気管支平滑筋弛緩作用はそれのみが単一の機序で起こるのではなく、他の平滑筋と同様に細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が生じていると考えられる。

今回の我々の実験では、カフェインによる気管支平滑筋収縮に際しての $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の由来は明らかではないが、ヒト気管支平滑筋での報告¹²⁾とも考え合わせると、カフェインをはじめとするキサンチン誘導体の臨床的な気道拡張作用は確立しているとはいえ、それに先立って一過性に気管支平滑筋収縮が生じうる可能性は否定できない。

次に、カフェインによる種々の刺激薬の平滑筋収縮の抑制についてであるが、今回の結果では、高カリウム投与による脱分極刺激で生じた収縮張力および $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対しカフェインは有意な抑制作用を示さなかった。この時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は細胞膜を介する Ca^{2+} の流入、流出を総合的にとらえているため直接的な証明にはならない。しかしながら、本実験結果より、ブタ気管支平滑筋においてはカフェインは細胞膜に存在する電位依存性カルシウムチャンネル(VOC)に対してほとんど影響を与えないことが推察された。

また、受容体刺激薬としてヒスタミンを用いた場合の気管支平滑筋収縮に与えるカフェインの影響については、その抑制作用機序として、先に述べた如く気管支平滑筋においてもカフェインが細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出を惹き起こしているためであろうと考えられる。このことは、Chideckelら¹²⁾が、カフェイン投与後、ヒスタミンやメタコリン等の受容体刺激を与えて

も、十分な収縮反応を引き起こすのに必要な Ca^{2+} が既に枯渇しているためであろうとしていることから推察される。カフェインの気道拡張作用の機序としては、以上のほかにホスフォジエステラーゼ阻害による cAMP の増加、カテコールアミンの放出、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化、アデノシンレセプターのブロック、プロスタグランジン生成阻害など¹⁻³⁾が考えられている。

一方、平滑筋の収縮、弛緩反応においては、Cキナーゼのように、活性化して収縮タンパクの感受性を増加させる、 $[Ca^{2+}]_i$ に依存しない調節因子があり¹⁰⁾、さらに細胞質中の cAMP, cGMP などによっても調節を受けているとされている。

今回の我々の結果では、カフェインは、それ自体が気管支平滑筋に対し収縮張力を生じさせ、同時に $[Ca^{2+}]_i$ を増加させたものの、ヒスタミン刺激に対してはその $[Ca^{2+}]_i$ の増加の抑制を伴わずに収縮張力を有意に抑制した。この結果より、ブタ気管支平滑筋において、カフェインは、その作用がどの経路を介するものかは今回の実験結果では明らかでないが、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化に依存しない収縮力抑制作用を持つことが強く示唆された。

結 論

ブタ気管支平滑筋における高カリウム、ヒスタミン刺激による収縮張力およびその際の $[Ca^{2+}]_i$ 変化、それらに対するカフェインの作用について蛍光カルシウム指示薬 fura-2 を用いて検討し、以下の知見を得た。

1. ヒスタミン刺激によるブタ気管支平滑筋の収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ はヒスタミン濃度依存性に増加した。

2. 細胞外 Ca^{2+} を除いた溶液中では、ヒスタミン刺激では収縮張力及び $[Ca^{2+}]_i$ 変化とも対照と比較し有意差を認めなかったが、高カリウム刺激ではその両者とも著明な減少を示した。

3. カフェイン投与により、一過性に収縮張力が生じ、同時に $[Ca^{2+}]_i$ の増加が認められた。

4. カフェインは、高カリウム刺激により発

生した収縮張力および $[Ca^{2+}]_i$ 増加に影響を与えなかった。

5. カフェイン存在下のヒスタミン投与は、収縮張力に有意な減少を示したが、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加には影響を与えなかった。

以上のことから、ブタ気管支平滑筋において、カフェインはそれ自体 $[Ca^{2+}]_i$ 増加に伴う収縮作用を示したが、脱分極刺激による収縮の抑制作用は見られなかった。また、ヒスタミン受容体刺激に対しては、 $[Ca^{2+}]_i$ に依存しない収縮抑制作用を持つことが示唆された。

本研究の要旨は第40回日本麻酔学会総会(1993年4月、盛岡)において発表した。また本研究の一部は平成3年度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。

参 考 文 献

- 1) 澄川耕二: 10. 気管支拡張薬, 恩地裕監修: 麻酔科入門, 改訂第5版, 永井書店, 大阪, 488-489ページ, 1991.
- 2) Wood, M. and Wood, A. A. J.: Drugs and anesthesia pharmacology for anesthesiologists, 2nd. ed., Williams & Wilkins, Baltimore, pp 537-551, 1990.
- 3) Andersson, R. G. G., Kovesi, G. and Ericsson, E.: Beta-adrenoceptor stimulation of cyclic AMP levels in bovine tracheal muscle of old and young animals. *Acta pharmacol.* 23: 323-327, 1978.
- 4) Saida, K.: Intracellular Ca^{++} release in skinned smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 80: 191-202, 1982.
- 5) Klockner, U. and Isenburg, G.: Calcium activated potassium currents as an indicator of intracellular Ca^{++} transients (single smooth muscle cells from trachea and urinary bladder). *Pflugers Arch.* 405, R 61, 1985.
- 6) 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.
- 7) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3340-3345, 1985.
- 8) 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.
- 9) Tsuchida, H., Namba, H. and Yamakage, M. : Effects of halothane and isoflurane on cytosolic calcium ion concentrations and contraction in the vascular smooth muscle of rat aorta. *Anesthesiology*, 78 : 531-540, 1993
- 10) Abdel-Latiff, A. A. : Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacol. Rev.* : 38, 227-272, 1986.
- 11) Mori, T., Yanagisawa, T., Taira, N. : Phorbol 12, 13-dibutyrate strongly increases vascular tone but has a dual action on intracellular calcium levels in porcine coronary arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* (in press)
- 12) Chidechel, E. W. and Anireddy, D. R. : Effect of caffeine on tone and intracellular Ca^{++} release in guinea-pig and human trachealis. *Arch. int. Pharmacodyn.* 311 : 166-176, 1991.
- 13) Small, R. C., Boyle, J. P., Cortijo, J., Curtis-Prior, P. B., Davies, J. M., Foster, R. W. and Hofer, P. : The relaxant and spasmogenic effects of some xanthine derivatives acting on guinea-pig isolated trachealis muscle. *Brit. J. Pharmacol.* 94 : 1091-1100, 1988.
- 14) Nishizuka, Y. : Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. 233 : 305-312, 1986.