

9031 血管平滑筋細胞に対する外液Naイオンの影響

富田 忠雄(名古屋大学)

多くの血管平滑筋は骨格筋や心筋と違って、活動電位を伴わずに持続的(緊張性)収縮を発生する。この収縮は外液中のナトリウムイオン(Na)を減少させると大きくなることから、神経や心筋などに存在することが知られているNaとカルシウムイオン(Ca)とが交換する過程が関与している可能性が考えられる。この過程は細胞内外のNaの濃度勾配を利用して細胞内Ca濃度を低く保つので、外液のNaを減らしてNaの濃度勾配を低下させると細胞内Ca濃度が上昇し、その結果収縮が起こり得る。イヌ冠動脈でのNa除去による収縮にはCaチャネルの遮断剤で抑制される要素と抑制されない要素とが含まれている。前者は細胞膜の脱分極を、後者はNa-Ca交換過程を介していることが推測される。Na-Ca交換過程では3個のNaと1個のCaが交換するためNaが動く方向へ電流が流れる。それで、家兎門脈の平滑筋の細胞においてNa-Ca交換電流の測定を試み、その性質を調べて見た。電流は膜電位固定法を用いて単離した細胞の膜全体を流れるものを記録した。この場合、Kチャネルは外液のTEAおよび電極内液のセシウム(Cs)で、Caチャネルはニフェジピンで遮断し、さらにNa-Kポンプを流れる電流はウバインで抑制しているため、細胞内外のNaやKの濃度を変化したとき記録される電流はNa-Ca交換過程によって発生したものと考えられる。細胞内のNaおよびCa濃度は膜電位固定に用いる電極を灌流する液の濃度と等しいと仮定した。細胞内のNaおよびCaの濃度を変化させると、Na-Ca交換過程から予測される膜電流を記録することが出来た。同じ条件であれば盲腸紐の細胞の電流の方が門脈のものよりも50%程大きかった。この電流は膜電位依存性を示し、外向き電流は過分極で、内向き電流は脱分極で減少し、その逆転電位(E_r)は $E_r = 3E_{Na} - 2E_{Ca}$ の式から求められる値にほぼ一致した(E_{Na} 、 E_{Ca} はそれぞれNaとCaの平衡電位)。外液のMgは外向き電流を減少させるが、50%に抑制する濃度は3mMであった。また、細胞内ATPはこの交換過程の担体への細胞内Caの結合の親和性を高めるという結果が得られた。外液のNaを除去したとき、Na-Ca交換過程で運ばれる電流は外向きであって、細胞膜は過分極することが予測される。しかし、実際には緩やかな脱分極が観察されるので、この脱分極にはNa-Ca交換過程と別な機序が関与するものと考えられる。一つの可能性としてはNaの除去でNa-H交換過程が止まり、細胞内が酸性に傾くためKチャネルが閉じ、その結果Kによる外向き電流が減少し、膜が脱分極することが考えられる。pHに感受性をもつ色素を用いてモルモット大動脈の平滑筋の細胞内pHの測定では細胞内pHの調節機構にNa-H交換過程が関与しているという結果が得られた。さらにモルモット気管の平滑筋で、細胞膜のK電流は細胞内の酸性化で強く抑えられるという結果も得られたので、Na除去による脱分極は細胞内の酸性化によるK電流の抑制のためであるとして説明できる。Na除去による収縮でCaチャネル遮断剤で抑制される要素はこの脱分極を介したCaの流入によるもので、抑制されない要素はNa-Ca交換過程を介したCa流入による収縮である可能性が考えられる。

9031 血管平滑筋細胞に対する外液Naイオンの影響

富田 忠雄 (名古屋大学)

1. 研究目的

神経や骨格筋での活動電位の発生にはナトリウムイオン(Na)が必要であるので、細胞外液の Na を除くと興奮しなくなる。しかし、平滑筋での活動電位は Na でなくカルシウムイオン(Ca)を利用しているので、この筋では Na の役割が違っていることが考えられる。多くの平滑筋では外液の Na 濃度を減らすと収縮を起こすことが知られ、また収縮は細胞内 Ca 濃度の上昇で起こるので、外液 Na 濃度の減少は何らかの機構で細胞内 Ca を増加させることが推測される。細胞内 Na を汲み出す Na ポンプを抑えるウバイン(ouabain)を与え、細胞内 Na 濃度を増したときにも収縮が発生するので、これらの収縮には Na の濃度勾配を利用して細胞内 Ca 濃度を低く保つ機構、すなわち細胞内への Na 流入によって Ca を細胞外へ汲み出す機構(Na-Ca 交換過程)が関与している可能性が考えられる。特に血管平滑筋においては、食塩の過剰摂取により細胞内外の Na 濃度勾配が低下し、Na-Ca 交換過程の機能が落ちて高血圧になるという説が出されて注目されている^{1) 2)}。しかし、外液の Na 濃度を減らしたときの収縮は必ずしも Na-Ca 交換過程を介したものでなく、平滑筋における細胞内 Ca 濃度の調節には ATP を用いた Ca ポンプの働きの方が主役を演じているとの考えもあって³⁾、平滑筋における Na-Ca 交換過程の意義はまだ明確でない。

外液の Na を除いたときの収縮には幾つかの違った過程が関与している可能性があり、また、Na-Ca 過程の関与の程度も平滑筋の種類によって異なっていることも考えられる。Na-Ca 交換過程では3個の Na が1個の Ca と交換するため、この電荷の差から Na が運ばれる方向へ電流が流れることになる。このことを利用して、心筋細胞では実際にこの電流が記録され^{4) 5)}、Na-Ca 交換過程が心筋の機能にかなり重要な影響を与えていることが明らかにされてきている。それで、本研究では、血管平滑筋における Na-Ca 交換過程についてさらに検討を加えるため、外液の Na 濃度を下げたとき起きる収縮の性質を調べると共に、特に電気生理学的に Na-Ca 交換過程によって細胞膜に発生する電流の測定から平滑筋細胞における Na-Ca 交換過程の存在を直接的に証明しようと試みてみた。

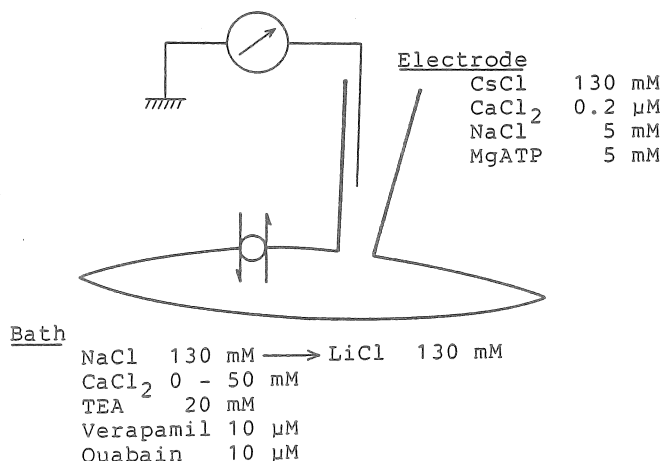
外液の Na を除くと Na-H 交換過程が停止して、細胞内が酸性になり、その結果細胞内への Ca 流入が増し、収縮が起きることも否定出来ない。家兎の気管平滑筋で行った今までの実験から、細胞内を酸性にすると K 電流が抑制されることが明らかになった⁶⁾。もし、実際に酸性化が起きれば、K 電流の減少のため細胞膜は脱分極し、その結果膜電位依存性の Ca チャネルが開き Ca が流入し収縮が起こることが推測される。それで、本実験では外液の Na を減少させたときの細胞内 pH の変化の測定も行った。

2. 研究方法

実験は主に筋切片の収縮に対する薬理的なものと、単一細胞における Na-Ca 交換電流の性質を調べた電気生理学的なものである。これ以外に細胞内 pH の測定も補助的な実験として行った。これらの実験は全て33-35°Cで行なった。

1) 収縮の実験にはイヌから摘出し、内膜を除いた冠動脈の筋切片(2 x 15 mm)を用いた。この筋切片を小さい試料槽に固定し、発生する張力をストレインゲージによって記録した。試料槽は1分間3 ml程度の一定速度で灌流した。正常溶液としては(mM) NaCl 125, KCl 6, CaCl₂ 2.4, MgCl₂ 1.2, glucose 11.8, Tris-HCl 10 (pH 7.4)の組成のものを用いた。NaClを減らすときには蔗糖あるいは choline chloride (10 μM atropine 添加)で等浸透圧的に置換した。

2) 膜電流を測定する電気生理学的な実験には、家兎の門脈を酵素処理して単離した平滑筋細胞を用いた。Na-Ca 交換電流を測定するために、この交換電流以外のK 電流、Ca 電流ならびに Na-K ポンプ電流を抑制した状態で、細胞内外の Na および Ca の濃度を变化させ、そのときに細胞膜全体を流れる電流をいわゆる whole-cell clamp 法によって記録した(第1図)。



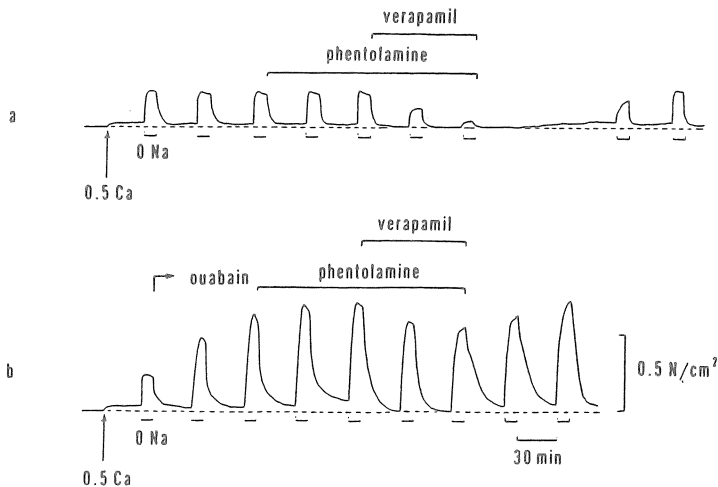
第1図 単離した平滑筋細胞の膜電流を記録するための whole-cell clamp 法の模式図。先端径1 μm程度のガラス電極(Electrode)を細胞膜に密着させた後、吸引によって細胞膜を破って電極内と細胞内を電気的に連絡させ、膜電位を任意の値に固定した状態で膜全体を流れる電流をこの電極を通して測定した。灌流液(Bath)中の TEA(tetraethylammonium)は K 電流を、verapamil は Ca 電流を、ouabain は Na-K ポンプ電流を抑制するためのものである。電極内液のセシウム(Cs)も K 電流を除くために用いた。多くの実験では外液の Na はリチウム(Li)で置換し、このような実験条件下で細胞内外の Ca あるいは Na 濃度を变化させ、その時流れる電流を分析した。

3) 細胞内の pH を測定する実験にはモルモットから摘出した大動脈の筋切片を用いた。平滑筋細胞に pH に感受性をもつ色素 (dimethylcarboxyfluorescein) を取り込ませ、筋組織の吸収スペクトルを瞬間マルチ測光検出器 (大塚電子) で測定した。このスペクトルの波形 (510 nm と 470 nm の波長の吸光度の比) から pH の変化を求めた。塩化アンモニウムを作用させると、作用時にはアルカリ化が作用後には酸性化が起きることが知られているので、基準的な pH の変化を観察するためには塩化アンモニウムを用いた。

3. 実験結果

1) イヌ冠動脈における外液 Na 除去による収縮

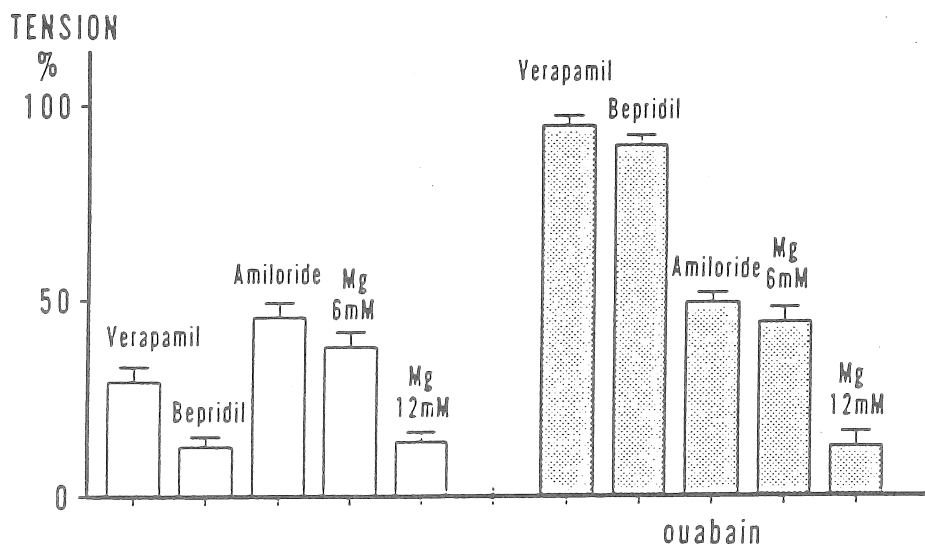
Na を除くと持続的な張力の発生が見られるが、この張力発生は外液の K 濃度を 20 mM 程度に増すことによって非常に増強され、また 20 mM K では Ca 濃度が 0.5 mM のときが正常 (2.4 mM) より大きい反応が記録されたので、以下の実験の多くはこの条件下で行った。第 1 図は Ca チャネルの遮断剤である verapamil の作用を示したものである。この実験は先ず Ca を含まない 20 mM K 液で灌流し、次に Ca を 0.5 mM に加えておいて、30 分間隔で 10 分間 Na を除いて収縮を起こさせた。この収縮は α 受容体を遮断する phentolamine では影響を受けないが、verapamil (0.1 μ M) で強く抑制された。Ouabain は細胞内 Na 濃度を増すことが知られているが、10 μ M ouabain を与えると Na 除去の収縮は大きくなり、4 回目の収縮の平均 (12 例) では $259 \pm 17\%$ に達した。このような状態では verapamil は非常に弱い作用しか示さなかった (第 1 図)。Na の置換に蔗糖を用いた場合も choline を用いても実験結果に本質的な差は見られなかった。



第 2 図 a: イヌの冠血管における Na 除去 (0 Na) による収縮に対する phentolamine (1 μ M) および verapamil (0.1 μ M) の作用。 b: ouabain (10 μ M) 存在下における同様の実験、ただし ouabain の濃度は 1 μ M。 a と b は別の筋切片。

Amiloride は高濃度(0.5-1 mM)で Na-Ca 交換過程を抑制するとの報告がある^{7) 8)}。今回のイヌの冠動脈での実験では amiloride は ouabain 処理と無関係に非常に効果的で、低濃度(25 μM)の amiloride を与えると、その後2回目に起こした Na 除去(0 Na)による収縮は ouabain で処理していないときに $46 \pm 4\%$ に、ouabain 存在下でも $50 \pm 2\%$ に抑えられ(それぞれ $n = 12$)、これらの間には有意な差はみられなかった。また amiloride(25 μM) は外液 K を 40 mM に増して(2.4 mM Ca)起こした収縮に対してもほぼ同様の抑制作用を示したので、Na-Ca 交換過程を抑えているとは結論できない。

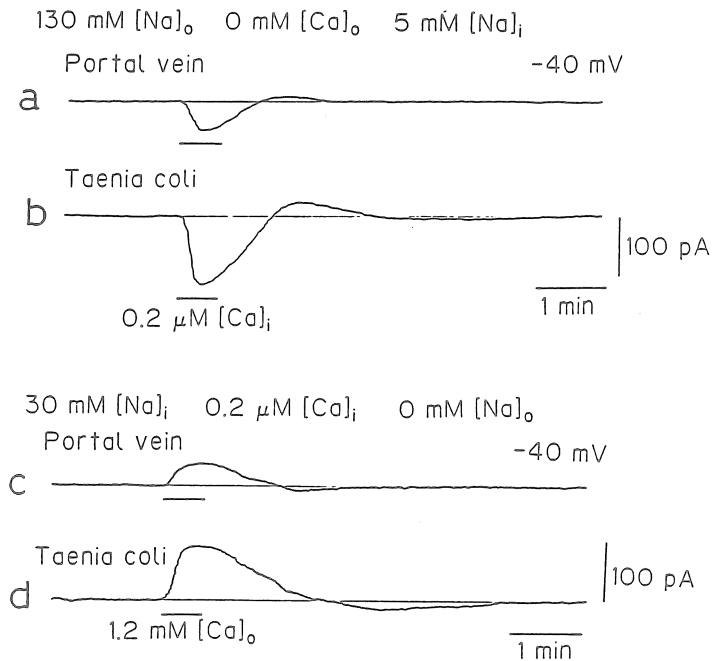
Bepridil も Na-Ca 交換を抑制すると報告されているが⁹⁾、1-25 μM の濃度での作用は amiloride よりも、むしろ verapamil の作用に似て、その抑制作用は ouabain 存在下で弱くなった。しかし、その作用の強さは verapamil の約 1/10 であった。マグネシウムイオン(Mg)も Na-Ca 交換過程を抑えると報告されている^{10) 11)}。Mg (6-10 mM) は ouabain の有る無しに拘わらず Na 除去の収縮を抑えた。Ouabain 処理前には 6 mM Mg で $39 \pm 4\%$ に、12 mM Mg では $15 \pm 2\%$ ($n = 12$) に減少させ、ouabain 処理後でも 6 mM Mg で 2 回目の収縮を $45 \pm 4\%$ に、12 mM Mg では $13 \pm 3\%$ に抑制した。第3図は Na 除去による収縮に対して用いた薬剤と Mg の作用を比較のために纏めて示したものである。



第3図 イヌ冠動脈での 0 Na による収縮に対する verapamil, bepridil, amiloride, および Mg の抑制作用を比較したもの。それぞれの薬剤および Mg を投与前の収縮を 100% とし、投与後の 2 回目の収縮の平均値と標準偏差を示している(それぞれ $n = 12$)。左側のグラフは ouabain 処理前、右側のもは ouabain(10 μM) 存在下での実験。Verapamil の濃度は ouabain 処理前は 0.1 μM、処理後は 1 μM であるが、その他の濃度は両方とも同じで、bepridil および amiloride は 25 μM, Mg は 6 および 12 mM を用いている。

2) Na-Ca 交換電流

家兔門脈およびモルモット盲腸紐から単離した平滑筋細胞において、Na-Ca 交換電流以外の電流系を出来るだけ遮断した実験条件下で、外液および電極内の Na 濃度をそれぞれ 130 mMと5 mMに、外液に Ca が無いとき、電極内に0.2 μ Mの Ca を与えると、第4図 a, b に示すような内向き電流を記録することができた。同様に、外液に Na がなく、電極内の Na および Ca 濃度がそれぞれ30 mMと0.2 μ Mのとき、細胞外に1.2 mMの Ca を与えると、第4図 c, d に示すように外向きの電流が記録された。これらの電流は Na-Ca 交換過程から予測されるように濃度勾配に従って Na が動く方向であるが、そのときの電流の大きさは、上の実験条件であれば家兔門脈での電流は約50 pA、モルモット盲腸紐のものでは約100 pAで、細胞の大きさはほぼ等しいにも拘わらず、門脈の方が約半分の大きさであった。

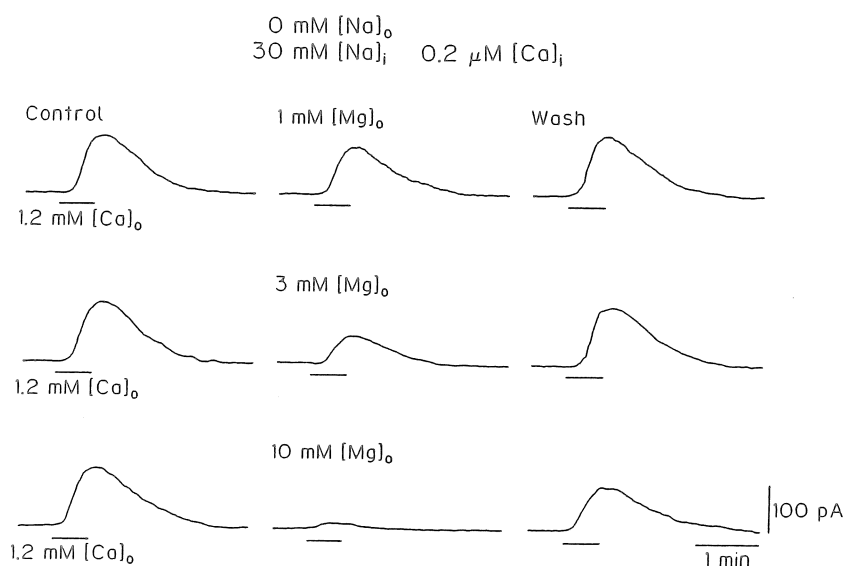


第4図 一定の Na の濃度勾配の条件下で、細胞内あるいは細胞外の Ca 濃度を变化させたときに、一個の平滑筋細胞から whole-cell clamp 法で記録した膜電流。膜電位を-40 mVに維持し、a, bでは外液中の Na, Ca 濃度をそれぞれ130, 0 mM、電極内の Na, Ca 濃度をそれぞれ5, 0 mMとしていて、電極内液の Ca 濃度を30秒間だけ0.2 μ Mにしたときに流れる内向き電流を記録したもの。a は家兔の門脈、b はモルモット盲腸紐の平滑筋細胞。Ca 濃度は電極内を灌流することによって变化させた。c, d は同様に、電極内液の Na, Ca 濃度をそれぞれ30 mM, 0.2 μ Mとし、細胞外液の Na を choline で置換しておいて、Ca 濃度を0から1.2 mMに増したとき記録された外向き電流。c, d はそれぞれ門脈および盲腸紐から単離した、a, b とは別の細胞。

第4図 c, d に示したように、細胞内外の Na の濃度をそれぞれ30 mMと0 mM、細胞内の Ca 濃度を0.2 μ Mに保っていて、細胞外に Ca を与えると外向きの電流が流れる。このときの電流の大きさは細胞外の Ca の濃度に依存して大きくなった。この関係は Hill の式で表され、10 mM 以上の Ca 濃度で最大電流に達し、最大の1/2の大きさの電流を生ずる Ca 濃度は約1.2 mMであり、Hill 係数は近似的に1であった。また、同じような実験で外液の Na 濃度と内向き電流の大きさとの関係を調べてみた。この場合には細胞外 Ca を0、細胞内 Ca を0.2 μ M、細胞内 Na を0 mMとした状態で、細胞外の Na 濃度を変化させた。このときの関係も Hill の式で表すことができ、最大電流はほぼ100 mM、最大の1/2の大きさの電流はほぼ50 mMの Na 濃度で得られ、この場合の Hill 係数は2.7であった。

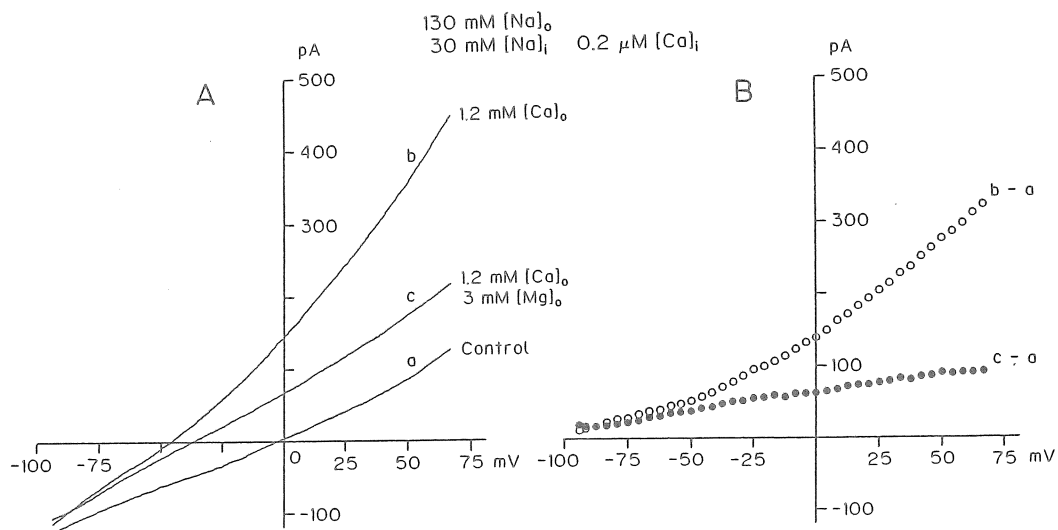
第2図に示したように、イヌの冠動脈における Na 除去による収縮は amiloride で強く抑えられるが、Na-Ca 交換電流に対する amiloride の作用は非常に弱く、1 mMの高濃度でも20%程度しか抑制しなかった。一方、Ca と拮抗すると考えられる、2価の Mn (1 mM)や3価の La (0.3 mM)イオンは外液の Ca 濃度を増したときの外向き Na-Ca 電流をほぼ完全に抑制した。

マグネシウムイオン(Mg)も第5図に示すように、濃度依存性に外向きの Na-Ca 交換電流を減少させた。50%に抑制する濃度はほぼ2.5 mMであった。Mg は Na-Ca 交換電流を小さくさせるだけで、その時間経過には大きい影響を与えなかった。また Mg による抑制からの回復は良好であった。



第5図 外向きの Na-Ca 電流に対する Mg の抑制作用(家兎門脈)。実験条件は第4図 c, d のものと同じで、外向き電流は外液に1.2 mM Ca を加えることによって発生させた。この実験の正常外液は Mg を含まず、Mg (1-10 mM)は 1.2 mM Ca を加える3分前に与えた。1.2 mM Ca は10分間隔で30秒間与えた。

第6図 A は外向きのNa-Ca 交換電流発生中の電圧-電流関係を調べたものである。できるだけNa-Ca 交換電流以外の電流系を遮断した状態でも、膜電位を変化させると膜電流が記録できた(a)。この電流が何に起因するかについては分析しなかったが、Na や塩素イオン(Cl)によるリーク電流がある程度関与している可能性が考えられる。b に示す電圧-電流曲線から分かるように、外液に1.2 mM Ca を与えると外向き電流が流れると共に、膜のコンダクタンスが増加し、これらは電位依存性をもつことが明らかである。この電流やコンダクタンスは 3 mM Mg を与えることによって著明に減少した(c)。Ca 投与によって流れるNa-Ca 交換電流の性質を明らかにするために、Ca を与えた後の電位-電流曲線(A の b, c) から投与前の曲線(a)を差し引き、Ca 依存性の電流成分だけの電位依存性を第6図 B. に示している。この図の b-a 曲線は Na-Ca 交換電流が電圧依存性をもつことを示している。すなわち、この電流は脱分極で大きくなり、過分極で小さくなる。Na-Ca 交換電流が膜電位依存性をもち、その逆転電位(E_r)は $E_r = 3E_{Na} - 2E_{Ca}$ (E_{Na} , E_{Ca} はそれぞれ Na および Ca の平衡電位)で求められることは理論的に導きだせるが、第6図での実験条件では $E_{Na} = +38$ mV, $E_{Ca} = +113$ mV であるので、 E_r は-112 mVとなって、実験結果と近似的に一致する。3 mM Mgは平衡電位を変えずに、膜のコンダクタンスを減少させるといえる(c-a 曲線)。

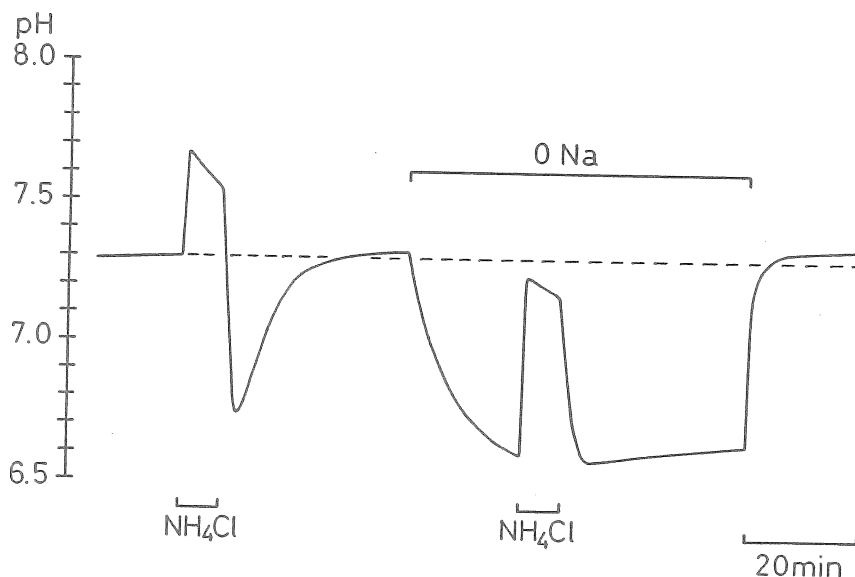


第6図 外向き Na-Ca 電流の膜電位依存性(家兔門脈)と Mg の作用。細胞内外の Na 濃度はそれぞれ30 mMおよび130 mM、細胞内 Ca 濃度は0.2 μ Mの条件で、外液に1.2 mM Ca を与えて外向き Na-Ca 交換電流を発生させた。Ca を与えて交換電流が最大に達したとき、200 mV/250 msの勾配をもつランプ電位パルスを与えて膜電位-電流関係を記録した。A: a は Ca 投与前、b は投与中、c は3 mM Mg 存在下での Ca 投与中の実験の記録。B: b-a, c-a はそれぞれ A における b および c から a の曲線を差し引いたもの。

3) Na 除去による細胞内の酸性化

この実験にはモルモット大動脈を用い、pH 感受性の色素(dimethylcarboxyfluorescein, Me₂CF)を細胞内に取り込ませ、その吸収スペクトルから細胞内 pH を推定した。細胞内 pH の較正は nigericin で細胞膜の H⁺ 透過性を高めた状態で行った。この方法で測定した細胞内 pH は、今までいわれている7.1-7.2よりもやや高い値(7.3)であった。これが外液の緩衝剤として、HCO₃-CO₂でなく HEPESを用いていることによるのか、この細胞の特徴なのか、あるいは測定上に問題があるのか、今後さらに検討する必要がある。

第7図に示すように、塩化アンモニウム(NH₄Cl, 20 mM)を与えると、アンモニア(NH₃)の細胞内への移行により細胞内はアルカリに傾き、NH₄Cl を除くと一過性に酸性になった後に回復した。外液の Na を除くとそれ自身で細胞内は次第に強く酸性に傾いてきた。この状態で NH₄Cl を与えると細胞内がアルカリに動くため、0 Naによる酸性化は殆ど消失したが、NH₄Cl を洗い流したときの酸性化は、すでに0 Na によって酸性になっているため明確でなかった。0 Na による酸性化は Na の再投与によって非常に速く回復した。細胞内の酸性化は外液中の Na 濃度が30 mM以下に減少すると起こり始めた。外液中の Na の置換には N-methyl-D-glucamine, choline あるいは蔗糖を用いたが、これらの間には本質的な差はみられなかった。NH₄Cl の効果はモルモット胃の平滑筋でもほぼ大動脈と同じであったが、Na を除いたときの細胞内の酸性化は大動脈の方が胃よりも著明であった。



第7図 モルモット大動脈の細胞内 pH に対する NH₄Cl および Na 除去の作用。細胞内 pH は Me₂CF-diacetate を細胞内に取り込ませて、大動脈壁の吸収スペクトル(475 nm と513 nmの波長の比) から求めた。NH₄Cl の濃度は20 mMで、7分間だけ与えた。Na を除くときは N-methyl-D-glucamine で置換した。

4. 考察

外液中の Na を除いたとき発生する収縮にはいくつかの違った機序が関与している可能性が考えられる。血管では Na 除去によって平滑筋組織内に分布する神経末端からカテコルアミンが放出され、 α アドレナリン作動性受容体を介して収縮を起こすことも考えられる。しかし、イヌ冠動脈では phentolamine でこの受容体を遮断しても同様の収縮が観察されたので、この要素は考慮する必要はないと思われる。Na を除いたときに見られる収縮は一般に Na-Ca 交換過程で説明されることが多い^{1) 2)}。この過程では、外液中の Na を除くと Na は外向きに、同時に Ca は内向きに動くはずで、この結果細胞内 Ca 濃度が増して収縮が起こることが予期される。もし、Na-Ca 交換によるのであれば Na-Ca 交換電流で実際に証明できたように、verapamil であまり影響を受けないはずである。しかし、イヌの冠動脈における Na 除去の収縮は verapamil で強く抑制される。この結果は Na-Ca 交換過程以外の関与を示唆している。しかし、ouabain で処理して Na ポンプを阻害すると Na 除去の収縮は verapamil の影響を受け難くなるので、細胞内 Na が増えたような状態では Na-Ca 交換過程の関与が相対的に大きくなるものと推測される。

Amiloride は Na-Ca 交換電流に対しては弱い抑制作用しか示さない。しかし、Na 除去の収縮では、ouabain 処理前も処理後も同様にかなり強い抑制がみられる。これらの結果は amiloride による Na 除去収縮の抑制作用は Na-Ca 交換過程を抑えるためでなく、収縮過程を直接阻害している可能性を示唆している。

外液から Na を除くと細胞内は酸性に傾く。これは恐らく Na-H 交換過程が止まるために、細胞内からの H⁺ イオンの汲み出しが阻害される結果であろうと推測される^{1) 2)}。この場合、もし、細胞内の酸性化によって K チャネルが抑えられ、しかもこの作用が Ca チャネルの抑制よりも強ければ、外向きの K 電流の減少により脱分極が起こり、膜電位依存性の Ca チャネルが活性化され、Ca による内向き電流が流れて収縮が起きることが考えられる。このように考えると、イヌ冠動脈でみられた verapamil による Na 除去の収縮の抑制を説明することができる。このような可能性、さらにはこのような過程と高血圧とが関連している可能性などについては今後さらに検討しなければならない。

⁴⁵Ca の動きや収縮の実験で報告されているように^{1) 11)}、Mg は Na-Ca 交換過程を抑制する作用をもっている。今回の実験ではイヌの冠動脈での収縮実験でこのことが確かめられただけでなく、Na-Ca 交換電流も同じ程度の Mg 濃度で抑制されるという結果が得られた。この Mg の作用は Na-Ca 交換過程で Ca と拮抗的に作用するためと考えられる。

家兎の門脈の平滑筋で記録された Na-Ca 交換電流の性質は心筋でのものと基本的に同じである。細胞膜の単位面積あたりの最大電流密度(約 3 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$)も近似的に同じである。心筋では Na-Ca 交換過程の機能に対する影響が次第に解明されてきているが、平滑筋における Na-Ca 交換過程の役割については未だ不明なことが多く、細胞内 Ca 濃度の調節にどの程度関与しているか今後さらに明らかにしていく必要がある。

5. 今後の課題

本研究によって平滑筋における細胞外液中の Na の働きがある程度明らかになってきた。しかし、実験方法の難しさのため、収縮を中心とした薬理学的実験、細胞膜の電流を測定する電気生理学的実験、さらには細胞内 pH を測定する光学的実験にはそれぞれ別の平滑筋を用いた。平滑筋はその機能によって微妙に性質を異にしていることが多いので、できれば同じ平滑筋を用いて多面的に研究を進める必要があると考えられる。今後、この線に沿って同じ平滑筋についての性質を深く分析するような努力をしていく予定である。

Na-Ca 交換電流の記録に成功したことが本研究の中核をなしているが、今のところ Mg の抑制効果は外向きの電流(Ca の流入)についてのものだけで、内向き電流(Ca の流出)に対してはまだ調べていない。内向き電流についても同じ強さで抑制するかどうか検討しなければならない。さらに Na-Ca 交換電流に対する細胞内 ATP や pH の影響についても今後の課題である。

細胞内 pH や Ca 濃度を光学的に測定する実験もさらに充実させ、平滑筋の収縮過程における外液の Na の関与、とくに Na-Ca あるいは Na-H 交換との関連について分析を続けていきたいと考えている。

6. 参考文献

- 1) Blaustein, M.P. (1974) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70, 33-82.
- 2) Blaustein, M.P. (1977) *Am. J. Physiol.* 232, C165-173.
- 3) Van Breemen, C., Aaronson, P., Loutzenhiser, R. & Meisheri, K. (1982) *Fed. Proc.* 41, 2891-2987.
- 4) Kimura, J., Miyamae, S. & Noma, A. (1987) *J. Physiol.* 384, 199-222.
- 5) Miura, Y. & Kimura, J. (1989) *J. gen. Physiol.* 93, 1129-1145.
- 6) Kume, H., Takagi, K., Satake, T., Tokuno, H. & Tomita, T. (1990) *J. Physiol.* 424, 445-457.
- 7) Floreani, M. & Luciani, S. (1984) *Europ. J. Pharmacol.* 105, 317-322.
- 8) Bova, S., Cargnelli, G. & Luciani, S. (1988) *Br. J. Pharmacol.* 93, 601-608.
- 9) Garcia, M.L., Slaughter, R.S., King, V.F. & Kaczorowski, G.J. (1988) *Biochem.* 27, 2410-2415.
- 10) Smith, J.B., Cragoe, E.J. & Smith, L. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 11988-11994.
- 11) Altura, B.T., Zhang, A. & Altura, B.M. (1990) *Magnesium Trace Elem.* 9, 163-175.
- 12) Mahnensmith, R.L. & Aronson, P.S. (1985) *Circ. Res.* 56, 773-788.

Effects of removal of external Na^+ ions on vascular smooth muscles

Tadao Tomita and Hiroyuki Tokuno
Department of Physiology,
School of Medicine, Nagoya University

Summary

Contractions produced by Na^+ removal were studied in muscle strips isolated from canine coronary artery. The contraction in the absence of Na^+ (0-Na, Na^+ being substituted by choline, sucrose or N-methyl-D-glucamine) was not affected by phentolamine but was strongly inhibited by verapamil. Ouabain slowly potentiated the 0-Na contraction and markedly reduced the inhibition due to verapamil. Amiloride and excess Mg^{2+} reduced the 0-Na contraction and the degree of their inhibition was similar after ouabain treatment. The decrease in verapamil susceptibility could suggest that the 0-Na contraction has verapamil-sensitive and -insensitive components. The former is probably due to Ca^{2+} influx through voltage-dependent channels and the latter to Ca^{2+} influx through Na^+ - Ca^{2+} exchange process.

In single cells dispersed enzymatically from the rabbit portal vein, Na^+ - Ca^{2+} exchange current could be recorded with the whole-cell voltage clamp method. The experiments were carried out under conditions in which Ca^{2+} and K^+ channels as well as a sodium pump were blocked. The direction of the current was depending on the concentration gradient of Na^+ and their property was very similar to that observed in cardiac cells. The exchange current was not much affected by amiloride (0.5 mM) and verapamil (0.01 mM), but strongly inhibited by excess Mg^{2+} (6-12 mM).

Intracellular pH was measured in the guinea-pig aorta, after loading a pH-sensitive dye, dimethyl-carboxyfluorescein (Me_2CF). 20 mM ammonium chloride (NH_4Cl) produced intracellular alkalization on application and transient acidification on removal. Removal of external Na^+ produced acidification and retarded recovery from NH_4Cl -induced acidification until readmission of Na^+ .

From these results, a possibility was considered that removal of external Na^+ blocks Na^+ - H^+ exchange, resulting in acidification and that this blocks K^+ channels, leading to membrane depolarization. The depolarization activates Ca^{2+} channels and produces contraction due to Ca^{2+} influx. This explains the susceptibility of the 0-Na contraction to verapamil. Ouabain treatment probably increases a contribution of Na^+ - Ca^{2+} exchange process to the 0-Na contraction, by increasing intracellular Na^+ concentration and reduces susceptibility to verapamil.