

9439 血管平滑筋の細胞内カルシウム動態と張力に対するマグネシウムの効果

助成研究者：阿部志麿子（中村学園大学 家政学部）

【目的】血管平滑筋の収縮・弛緩における細胞外マグネシウムの作用機序を明らかにするために、ブタ冠動脈摘出血管を用いて、細胞内カルシウム濃度変化および張力変化に対するマグネシウムの効果について検討した。

【方法】ブタ心臓から摘出した冠動脈を用い、内膜および外膜を除去した幅0.5mm、長さ4mm、厚さ0.1mmの微小中膜血管条片を作成した。細胞内カルシウム濃度の指標としてカルシウム指示蛍光色素fura-2を負荷し、細胞内カルシウム濃度ならびに張力を同時測定した。

【結果】安静状態、高カリウム脱分極刺激ならびにヒスタミン刺激状態において、外液マグネシウムは細胞内カルシウム濃度と張力の発生を抑制した。また、高カリウム刺激時の外液カルシウム累積投与による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生を抑制した。しかしながら、無カルシウム溶液中のヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の上昇に対しては外液マグネシウムは抑制効果を示さなかった。さらに、マグネシウム投与の有無に関わらずいずれの場合においても細胞内カルシウム濃度－張力関係は一定であった。

【考察】高カリウム脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇は細胞外から細胞内へのカルシウム流入による。一方、ヒスタミン刺激においては細胞外からのカルシウム流入とヒスタミンに感受性のある細胞内貯蔵部からのカルシウム放出により細胞内カルシウム濃度が上昇する。脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力上昇に対してマグネシウムが抑制効果を示し、無カルシウム溶液中のヒスタミン刺激に対して抑制効果を示さなかったことから、マグネシウムは細胞内カルシウム貯蔵部からのカルシウム放出を抑制せず、細胞外からのカルシウム流入を抑制することによって血管弛緩を引き起こすことが明らかとなった。さらに、マグネシウム投与は細胞内カルシウム濃度－張力関係を変化させないことから、摘出血管の張力低下の程度は細胞内カルシウム濃度低下と密接な関係にあり、外液マグネシウムは収縮蛋白系には影響しないことが示唆された。

【総括】ブタ冠動脈血管平滑筋において外液マグネシウムは細胞外からのカルシウム流入を抑制することによって血管弛緩を引き起こすことが明らかとなった。



## 9439 血管平滑筋の細胞内カルシウム動態と張力に対するマグネシウムの効果

助成研究者：阿部志磨子 (中村学園大学 家政学部)

## 1. 研究目的

血管平滑筋の収縮・弛緩の制御には細胞内カルシウムイオンが重要な役割を果たしている。他方、マグネシウムイオンは全ての細胞に存在し、酵素活性やエネルギー代謝過程などに重要な役割を演じると同時に、生体内においては生理的なカルシウム拮抗薬として働き、種々の生理作用においてカルシウムの作用と拮抗している。従来から臨床の場において、マグネシウムの静脈内投与が血管弛緩作用や抗不整脈作用を示すことは経験的に知られているが、その作用機序については未だに不明な部分が多い。本研究は、血管平滑筋の収縮・弛緩における細胞外マグネシウムの作用機序を明らかにするために、ブタ冠動脈摘出血管を用いて、細胞内カルシウム濃度変化および張力変化に対するマグネシウムの効果について検討した。

## 2. 研究方法

## 2.1 微小中膜血管条片の作成およびカルシウム指示蛍光色素の負荷

ブタ心臓の左冠動脈回旋枝の基始部から2～3cmの部位を摘出し、実体顕微鏡下で内皮および外膜を除去し、幅0.5mm、長さ4mm、厚さ0.1mmの微小中膜血管条片を作成した。

カルシウム指示蛍光色素fura-2の負荷には、fura-2の膜透過型であるfura-2/AMを用いた。中膜条片を25 $\mu$ Mのfura-2/AMを含むDulbecco-modified Eagle's 溶液中に静置し、95%O<sub>2</sub>と5%CO<sub>2</sub>を含む混合ガスを飽和しながらpH7.4に保ち、37℃で3～4時間インキュベートした。

## 2.2 摘出血管の張力と細胞内カルシウム動態の同時連続測定

血管条片を生理的塩溶液で満たした石英製標本槽中に垂直に吊し、下端を固定し、上端を張力トランスデューサーに接続し、250mgの安静時負荷張力をかけて張力を測定した。

血管条片におけるfura-2・カルシウム複合体の蛍光強度測定は、日本分光(株)との共同

開発による蛍光光度計CAM-OF-1を用いて行った<sup>1)</sup>。キセノンランプを光源とし、400Hzで340nmと380nmの2波長励起を行い、得られた表面蛍光を500±10nmのバンドパスフィルターを介して高電子増倍管に導いた。得られた細胞内カルシウム濃度変化と張力変化のデータはマックラブシステムを介してコンピューター解析を行った。

細胞内カルシウム濃度および発生張力の値は、安静状態(5.9mMカリウムを含む溶液中)を0%、118mMカリウム溶液による高カリウム脱分極状態を100%として相対的に表現した。

### 2.3 統計処理

結果は、平均値±標準誤差で表した。統計的検索は、分散分析、共分散分析、Student's t-testを行い、危険率5%以下 ( $p < 0.05$ ) を有意差ありとした。

## 3. 研究結果

### 3.1 高カリウム脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力発生に対する外液マグネシウムの効果

血管条片を25mMカリウム溶液で脱分極刺激を行うと細胞内カルシウム濃度上昇とともに張力が発生した。細胞内カルシウム濃度と張力の値は各々70.4±4.1%と45.6±2.6%であった。図1aに示すように、脱分極刺激10分後に5mMマグネシウムを投与すると細胞内カルシウム濃度と張力は各々25.7±3.5% ( $p < 0.001$ )と9.2±1.7% ( $p < 0.001$ )と有意に低下し、2分以内に定常状態に達した。図1bに示すように、外液マグネシウムは25mMカリウム脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生を用量依存性に抑制した。

静止状態(5.9mMカリウム溶液)の血管条片に、2.5mMマグネシウムを15分間前投与すると細胞内カルシウム濃度は静止レベルから-4.9%まで徐々に低下し、張力は静止時よりも-1.9%低下した。次いで、25mMカリウム溶液で脱分極刺激を行うと、細胞内カルシウム濃度と張力は、43.8±2.6% ( $p < 0.001$ )と36.5±3.7% ( $p < 0.001$ )と有意に抑制された(図2a,b)。図2bに示すように、外液マグネシウムは、25mMカリウム脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生を用量依存性に抑制した。

### 3.2 高カリウム脱分極刺激時の外液カルシウム累積投与による細胞内カルシウム濃度上昇と張力発生に対する外液マグネシウムの効果

血管条片を118mMカリウム溶液で脱分極刺激を行いながら、外液のカルシウム濃度を0.05mMから5.0mMまで累積的に上昇させると、用量依存性に細胞内カルシウム濃度と張力が上昇した(図3b)。細胞内カルシウム濃度と張力の最大値は各々 $112.0 \pm 0.8\%$ と $119.0 \pm 2.2\%$ であった。図3a,bに示すように、20mMマグネシウムを前投与した後に同様の刺激を行うと、外液カルシウム累積投与により引き起こされた細胞内カルシウム濃度上昇と発生張力の最大値は各々 $86.3 \pm 1.0$ ( $p < 0.001$ )と $94.1 \pm 5.8$ ( $p < 0.001$ )と有意に抑制された。また、図3cに示すように、マグネシウム投与は細胞内カルシウム濃度-張力関係を変化させなかった。

### 3.3 ヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力発生に対する外液マグネシウムの効果

血管条片にヒスタミンを累積投与( $10^{-7}\text{M} \sim 10^{-4}\text{M}$ )すると細胞内カルシウム濃度と張力はヒスタミンの濃度に依存して上昇した(図4b)。ヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度と張力の最大値は各々 $91.0 \pm 10.3\%$ と $132.6 \pm 6.0\%$ であった。図4aに示すように、20mMマグネシウムを前投与した後に同様の刺激を行うと、ヒスタミン刺激により引き起こされた細胞内カルシウム濃度上昇と発生張力の最大値は、各々 $38.2 \pm 7.3\%$ ( $p < 0.001$ )と $79.1 \pm 9.9\%$ ( $p < 0.001$ )と有意に抑制された。図4bに示すように、外液マグネシウムは、ヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生を用量依存性に抑制した。

### 3.4 2mMEGTAを含む無カルシウム溶液中におけるヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力発生に対する外液マグネシウムの効果

血管条片を無カルシウム溶液中におくと、張力は変化せずに細胞内カルシウム濃度のみが徐々に静止レベルより低下し15分以内に定常状態に達した。無カルシウム溶液中の血管条片を $10^{-5}\text{M}$ ヒスタミンで刺激すると、細胞内カルシウム濃度上昇と張力は一過性に上昇し約15分後に定常状態に達した(図5a)。図5bに示すように、無カルシウム溶液中のヒスタミン刺激による一過性の細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生はマグネシウム投与の影響を受けなかった。

## 4. 考察

本研究では、カルシウム指示蛍光色素fura-2を負荷させたブタ冠動脈血管条片の細胞内カルシウム濃度と張力を同時測定し、血管条片の細胞内カルシウム濃度と張力に対する外

液マグネシウムの効果について検討した。

安静状態、高カリウム脱分極刺激ならびにヒスタミン刺激状態において、外液マグネシウムは細胞内カルシウム濃度と張力の発生を抑制した。また、高カリウム刺激中の外液カルシウム累積投与による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の発生を抑制した。一方、無カルシウム溶液中のヒスタミン刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力の上昇に対しては外液マグネシウムは抑制効果を示さなかった。

高カリウム脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇は細胞外から細胞内へのカルシウム流入による。一方、ヒスタミン刺激においては細胞外からのカルシウム流入とヒスタミンに感受性のある細胞内カルシウム貯蔵部からのカルシウム放出により細胞内カルシウム濃度が上昇する。脱分極刺激による細胞内カルシウム濃度上昇と張力上昇に対してマグネシウムが抑制効果を示し、無カルシウム溶液中のヒスタミン刺激に対して抑制効果を示さなかったことから、マグネシウムは細胞内カルシウム貯蔵部からのカルシウム放出を抑制せず、細胞外からのカルシウム流入のみを抑制することによって血管弛緩を引き起こすことが明らかとなった。さらに、いずれの場合においても細胞内カルシウム濃度－張力関係はマグネシウムの投与の有無に関わらず一定であった。すなわち、弛緩の程度は細胞内カルシウム濃度低下と密接な関係にあり、外液マグネシウムは収縮蛋白系には影響しないことが示唆された。

以上の結果より、マグネシウムは、1)細胞外からのカルシウム流入を抑制し、2)細胞内のカルシウム貯蔵部からのカルシウム放出や収縮蛋白系に影響を与えず、血管を弛緩することが示唆された。

## 5. 総括

ブタ冠動脈血管平滑筋において外液マグネシウムは細胞外からのカルシウム流入を抑制することによって血管弛緩を引き起こすことが明らかとなった。

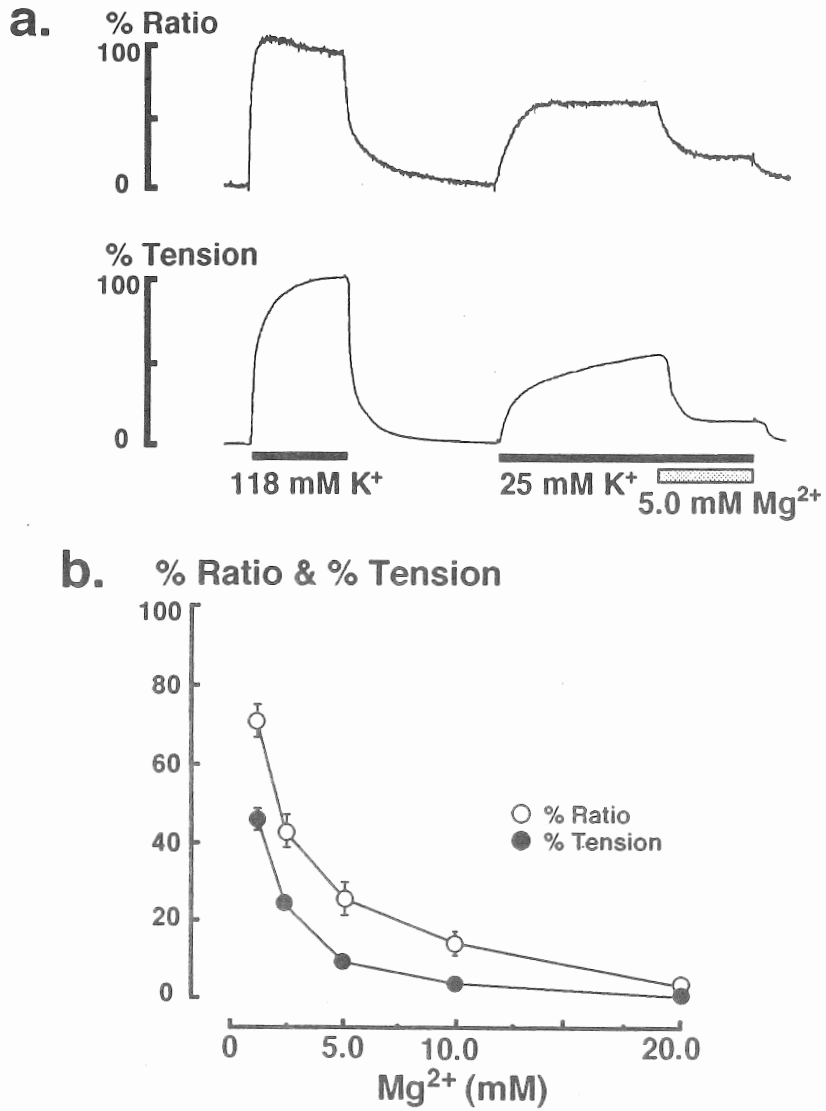
## 6. 今後の課題

本研究において、正常動物の血管平滑筋ではマグネシウム投与が細胞内カルシウム濃度を低下させ血管弛緩を起こすことが明らかとなった。Alturaら<sup>2,3)</sup>は、種々の血管平滑筋を用いて収縮反応性とMg濃度との間に逆相関が存在することを示し、西尾ら<sup>4)</sup>はマグネシウム欠乏ラット摘出血管の血管作動物質に対する収縮反応が異常に亢進することを報告している。助成研究者らは、マグネシウム欠乏食飼育ラットにおいて、血清マグネシウム

濃度が正常ラットに比し低く、他方、血清カルシウム濃度が高いことを認めた<sup>5,6)</sup>。また、これらのラットは易刺激性で興奮しやすく、痙攣発作や突然死を誘発しやすいことも認められた。しかしながら、マグネシウム欠乏状態という病的な血管における細胞内カルシウム動態については研究報告が少ない。このため、本研究で用いた方法をマグネシウム欠乏動物の摘出血管に応用し、病的な状態の血管平滑筋の細胞内カルシウム動態と収縮反応についての研究を行うことが今後必要と思われる。

## 6. 参考文献

1. Abe S., Kanaide H. & Nakamura M. Front-surface fluorometry with fura-2 and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 545-552, 1990.
2. Altura, B. M. & Altura, B. T. Magnesium ions and contraction of vascular smooth muscle: Relationship to some vascular diseases. *Fed. Proc.*, 40: 2672-2679, 1981.
3. Altura, B. M., Altura, B. T., Altura, A., Gebrewold, H. Ising & Gunther. Magnesium deficiency and hypertension: correlation between magnesium -deficient diets and microcirculatory changes. *Science*, 223: 1315-1317, 1984.
4. Nishio, A., Ishiguro, S., Shimonishi, I. & Hirata, A. Enhanced contractile response to noradrenaline and calcium influx in thoracic aorta isolated from dietary magnesium deficient rats. *Magnesium Research*, 2: 173-178, 1989.
5. Goto, Y., Nakamura, M., Abe, S. & Fukui, M. Physiological correlates of abnormal behaviors in magnesium-deficient rats. *Epilepsy Research*, 15: 81-89, 1993.
6. Nakamura, M., Abe, S., Goto, Y., Chishaki, A., Akazawa, K. & Kato, M. In vivo assessment of prevention of white-noise-induced seizure in magnesium-deficient rats by N-methyl-d-aspartate receptor blocker. *Epilepsy Research*, 17: 249-256, 1994.



**Fig.1** Effects of Mg<sup>2+</sup> on the increases in fluorescence ratio (% Ratio) and tension development (% Tension) induced by high K<sup>+</sup>-depolarization



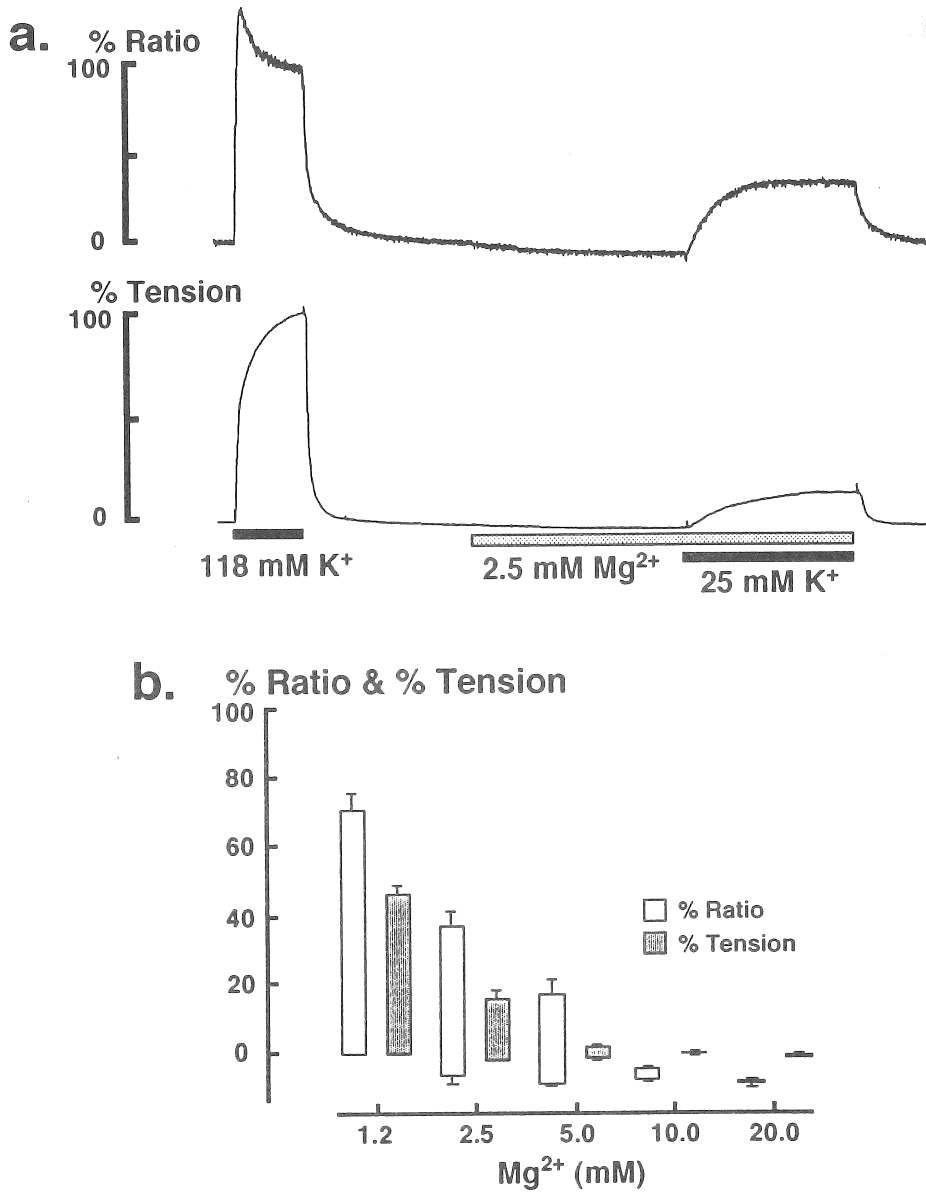


Fig.2 Effects of pretreatment with Mg<sup>2+</sup> on the increases in the fluorescence ratio and tension induced by high K<sup>+</sup>-depolarization

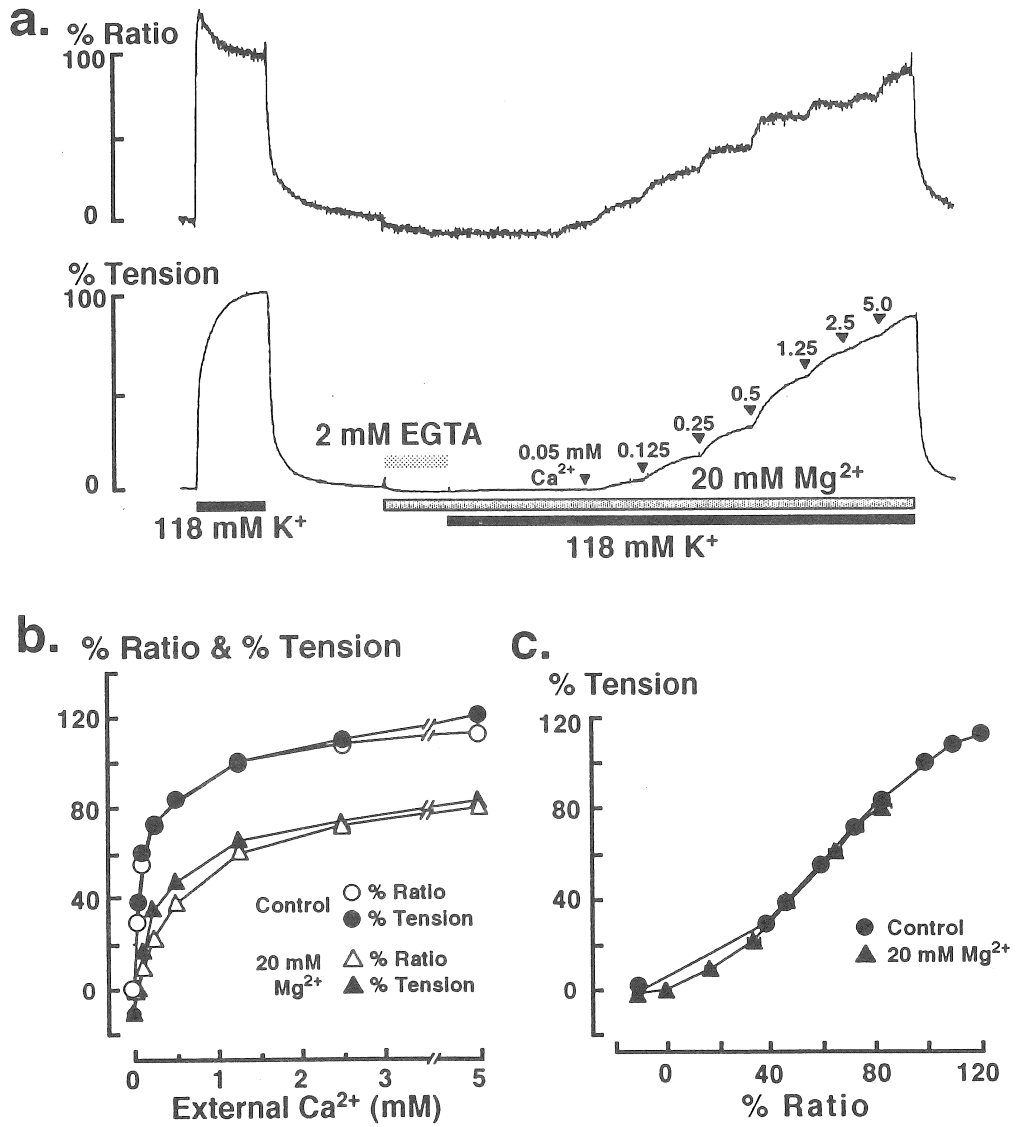


Fig.3 Effects of Mg<sup>2+</sup> on the increases in the fluorescence ratio and tension development induced by the cumulative application of various concentration of external Ca<sup>2+</sup> during 118 mM K<sup>+</sup>-depolarization

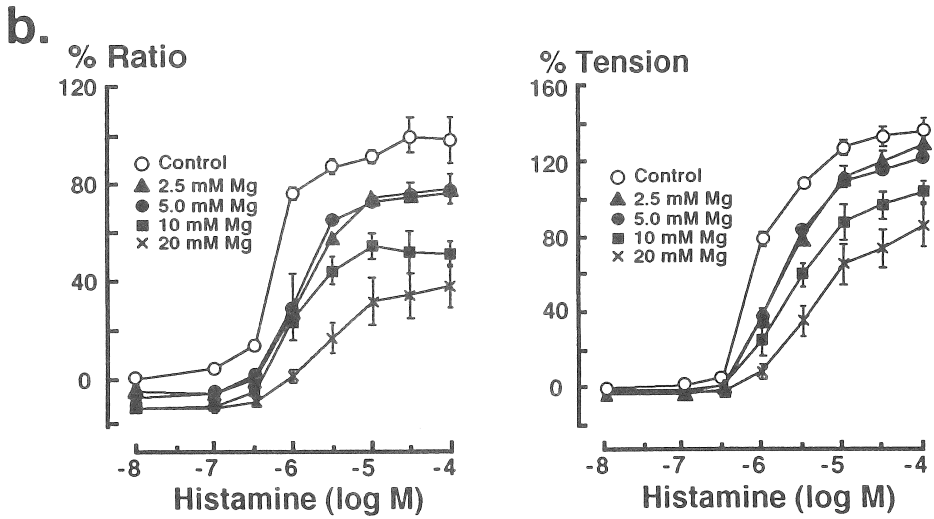
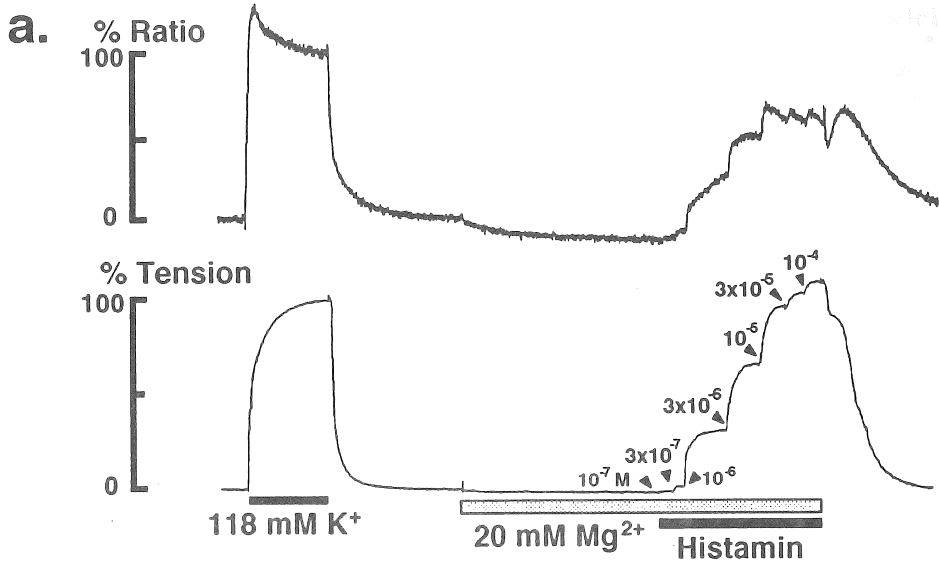
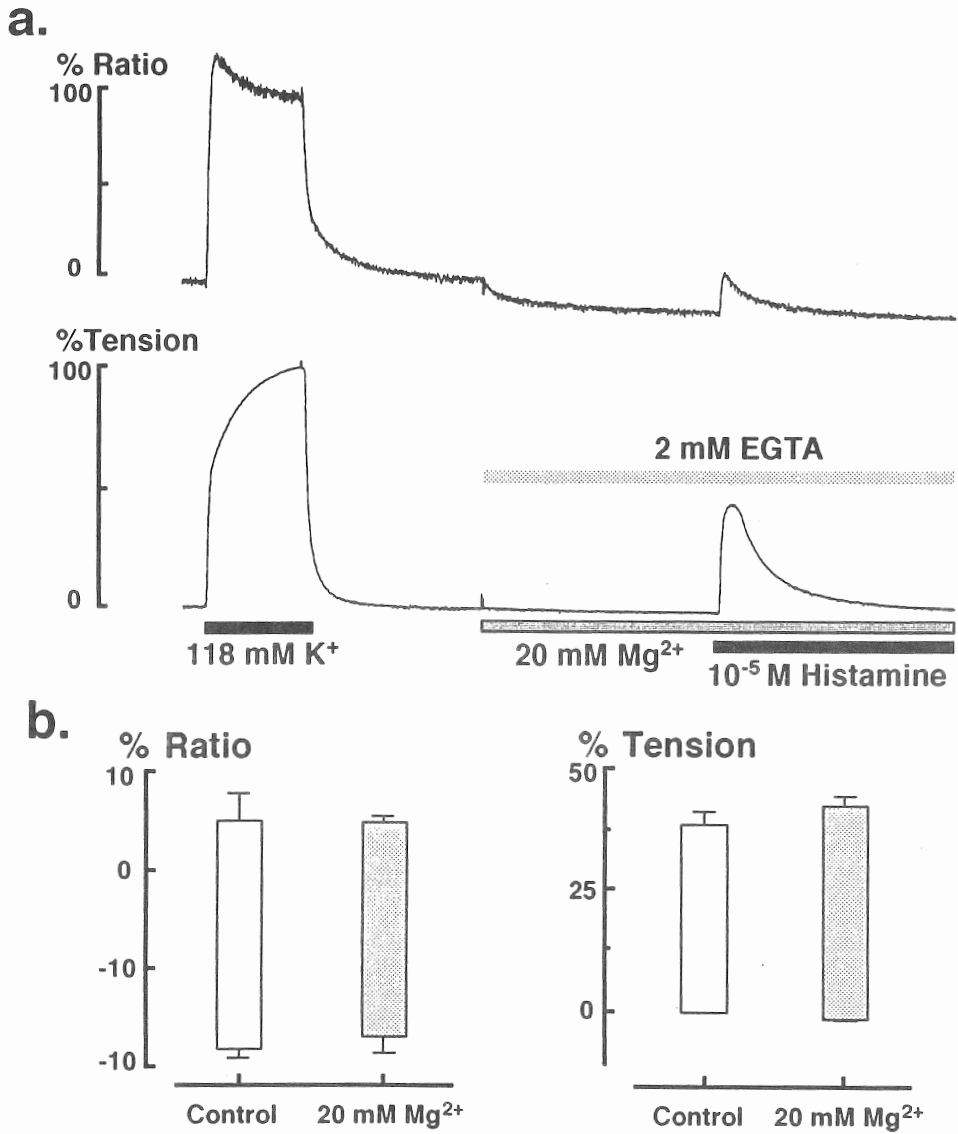


Fig.4 Effects of Mg<sup>2+</sup> on the increases in fluorescence ratio and tension development induced by histamine



**Fig.5** Effects of Mg<sup>2+</sup> on the increases in fluorescence ratio and tension development induced by histamine stimulation in Ca<sup>2+</sup>-free solution containing 2 mM EGTA

**Effects of extracellular magnesium ion on intracellular calcium concentration and on tension development in isolated pig coronary arterial strips.**

**Shimako Abe**

**Division of Nutrition, Nakamura-Gakuen University, Fukuoka, Japan.**

**Summary**

It is well known that magnesium ion ( $Mg^{2+}$ ) modulates tone and contractility of vascular smooth muscle. To clarify mechanisms by which  $Mg^{2+}$  relaxes vascular smooth muscle cells (VSMC), we determined the effect of  $Mg^{2+}$  on cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and tension, using pig coronary arterial strips loaded with fura-2.  $Mg^{2+}$  reduced both  $[Ca^{2+}]_i$  and tension, irrespective of whether the strips were in a resting state, or during exposure to high  $K^+$ , or to histamine stimulation. After pretreatment with  $Mg^{2+}$ , the elevation of  $[Ca^{2+}]_i$  and tension induced by high  $K^+$ -depolarization or histamine stimulation was inhibited in a concentration-dependent manner. In response to the cumulative application of external  $Ca^{2+}$  during  $K^+$ -depolarization,  $[Ca^{2+}]_i$  and tension increased in a concentration-dependent manner. The  $[Ca^{2+}]_i$ -tension relationship of these  $Ca^{2+}$ -induced contractions obtained in  $Mg^{2+}$ -treated strips overlapped that obtained in untreated strips. In the absence of extracellular  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  had no effects on  $[Ca^{2+}]_i$  and tension elevated by histamine stimulation. These results suggest that  $Mg^{2+}$  relaxes the VSMC of the pig coronary artery by directly reducing  $[Ca^{2+}]_i$ , with no effects on the release of  $Ca^{2+}$  from store site or on  $Ca^{2+}$ -sensitivity of the contractile elements.