

血管平滑筋の張力およびイオン動態
に対する強心配糖体の作用
に関する研究

尾崎 博

目 次

1	序 章	
1-1	緒 言	1
1-2	強 心 配 糖 体	6
1-2-1	強 心 配 糖 体 に つ い て	6
1-2-2	強 心 配 糖 体 の 一 般 薬 理 作 用	7
1-2-3	Na, K-ATPase と 強 心 配 糖 体	9
1-2-4	心 筋 に 対 す る 強 心 配 糖 体 の 作 用	13
1-2-5	平 滑 筋 に 対 す る 強 心 配 糖 体 の 作 用	22
1-3	Na - Ca 交 換 機 構	26
1-3-1	Na - Ca 交 換 機 構 に つ い て	26
1-3-2	平 滑 筋 に お け る Na - Ca 交 換 機 構 の 研 究	31
1-3-3	本 研 究 の 目 的	40

2	実験材料および方法	
2-1	実験材料	42
2-2	外膜除去標本の作製	43
2-3	栄養液の調製	44
2-4	張力記録法	46
2-5	^{45}Ca 動態	46
2-6	細胞内 Na および K 量の測定	52
2-7	供試した薬物	56
2-8	統計処理	56

3 実験成績

3-1	各種血管平滑筋に対するウワ バインおよび K 除去液の収縮 作用	58
3-1-1	ウワバインの収縮作用	58
3-1-2	K 除去液の収縮作用	61
3-1-3	K 除去液による細胞内 Na お よび K 量の変化	67
3-1-4	まとめ	70

3-2	モルモット大動脈におけるウ ワバインおよびK除去液の収 縮作用	71
3-2-1	Naポンプ抑制との関連	72
3-2-2	外液のCaおよびNaに対する 依存性	78
3-2-3	有機Ca拮抗薬の作用	79
3-2-4	高濃度Mgの影響	96
3-2-5	Srの代替性	98
3-2-6	⁴⁵ Ca動態	100
3-2-7	まとめ	105
3-3	血管平滑筋に対するNa除去液 の作用	106
3-3-1	各種動物の大動脈標本に対 するNa除去液の収縮作用	107
3-3-2	モルモット大動脈に対する Na除去液の収縮作用	110
3-3-3	張力と細胞内Na量との関係	117

3-3-4	細胞内 Na 流出に対する外液 Ca の影響	125
3-3-5	^{45}Ca 動態	125
3-3-6	筋弛緩に対する Na 除去液の 影響	126
3-3-7	まとめ	132
3-4	ウワバインの特異作用	134
3-4-1	正常 Na 液中におけるウワバ インと K 除去液との作用の 比較	135
3-4-2	Na 除去液中におけるウワバ インと K 除去液との作用の 比較	137
3-4-3	まとめ	146
3-5	実験成績のまとめ	147

4 考察

4-1	ウワバインおよび K 除去液に よる収縮について	150
-----	-----------------------------	-----

4-1-1	内因性カテコラミンの放出	151
4-1-2	細胞膜の脱分極の関与	154
4-1-3	Na - Ca 交換機構の関与	161
4-1-4	細胞内 Na 蓄積にともなう細胞内小器官の Ca 代謝の変化	168
4-1-5	細胞内 K の流出	173
4-2	Na 除去液による収縮について	175
4-2-1	Na の置換物質について	175
4-2-2	Na - Ca 交換機構の関与	178
4-3	Na - Ca 交換機構の生理的役割	180
4-4	平滑筋における強心配糖体の特異作用	185
4-5	高血圧の病態生理と Na - Ca 交換機構	187
4-6	まとめ	191
5	総括	195
5-1	血管平滑筋に対するウワバイオンおよび K 除去液の収縮作用	197

5-2	K 除去液による収縮と細胞内 Na 量との関係	198
5-3	モルモット大動脈におけるウワバインと K 除去液による収縮の性格および ^{45}Ca 動態	199
5-4	血管平滑筋に対する Na 除去液の収縮作用	201
5-5	モルモット大動脈におけるウワバインおよび K 除去液による収縮作用の比較	202
6	文献	206

実験に用いた元素記号一覧

Na	ナトリウム	Ca	カルシウム
K	カリウム	Sr	ストロンチウム
Li	リチウム	Ba	バリウム
Cs	セシウム	Mg	マグネシウム
Rb	ルビジウム	La	ランタン

1 序章

1-1 緒言

ウワバインやジギタリスで代表される強心配糖体は、心筋収縮力を高める作用があり、医学のみならず獣医学の領域において心不全の治療に用いられて著しい治療効果を示す。強心配糖体の心筋収縮力増強作用の機序に関する研究は、薬理学研究の歴史の中では重要な命題の一つであり、多くの研究者によりその解明が試みられているが、今日でもなお未解決の問題として残されている。一方、強心配糖体は、 Na, K-ATPase ($\text{Na, K-dependent adenosinetriphosphatase}$) (Na ポンプ) を低濃度で強く抑制することが知られ、生物科学の基礎領域においては、いわゆる「薬理学的道具」 (*pharmacological tool*) として広く用いられている薬物でもある。

一方、強心配糖体は、心臓のみならず種々

の平滑筋の興奮あるいは収縮に対しても作用を持つことが知られている。血管平滑筋に対して強心配糖体は、収縮作用あるいは収縮増強作用を示すが、特に血管平滑筋に対する作用については、循環器の一部としての意義から、心臓に対する作用とともに多くの関心が持たれている。

平滑筋の収縮機構に関する研究は、骨格筋あるいは心筋の研究にくらべて比較的新らしく、今日でもなおその興奮 - 収縮連関 (Excitation - Contraction Coupling) は充分解明されてはいない。しかし、平滑筋収縮が細胞内遊離 Ca 濃度の増加により調節されていることは、骨格筋あるいは心筋における機構と同様に確立された知見である。すなわち、平滑筋の静止時には細胞内の遊離 Ca 濃度は、細胞内小器官や細胞膜に存在する Ca 排出機構により低く ($10^{-7}M$ 以下) 保たれているが、平滑筋細胞が興奮すると細胞内 Ca 濃度が上昇し、筋収縮が発生する。その際の Ca の供給源としては、1) 細

胞膜表在性Caあるいは細胞間隙中のCaの流入

2) 筋小胞体あるいはミトコンドリアなどのCa貯蔵部位からのCaの遊離 3) 細胞外へのCa排出機構の抑制, などが考えられる。平滑筋においては, これらのCa供給源のうちで, 特に細胞を介するCaの移動が重要であると考えられている。

細胞膜の基本構造は脂質の二重の分子層であるが, これ自体はきわめてイオンを透過しにくい性質を持っており, イオン輸送に対して強い障壁となっている。しかし脂質二分子層にはイオン輸送性の蛋白分子が埋め込まれていて, これが電気化学的勾配に従ったイオンの移動, あるいはこれに逆らったイオンの駆動を行なっている。細胞膜におけるイオンの輸送径路として現在考えられているものには, チャンネル, キャリアー, ポンプなどがある。チャンネルは, 水分子を通過させることができる小孔であり, これをイオンが通過する際にイオン電流としてとらえることが可能

で、電気生理学的手法を用いて詳しく検討されている。キャリアーは、イオンを結合した後、細胞膜を横切る方向に移動することによりイオンを輸送する機構で、細胞膜の流動性に影響される。キャリアーは一般に同種あるいは異種のイオンを反対側に輸送する。ポンプは、ATPの加水分解により生ずるエネルギーを利用して濃度勾配に逆らってイオンを輸送するものであり、Naポンプ (Na,K-ATPase)、Caポンプ (Ca-ATPase) などの存在が知られている。このポンプ機構は、イオンの輸送を酵素反応としてとらえることができることから、生化学的手法を用いて詳細に検討されている。

近年、細胞膜を介するCa移動の経路の一つとして、Na-Ca交換機構の存在が神経や心筋細胞で示唆されている。これは細胞内外のNaの動きが、Caとの交換によりなされる機構で、上記のイオン輸送の分類のなかではキャリアーに属している。一般の興奮細胞は、Naポンプによって細胞内Naは低く保たれているが、

もし Na ポンプの機能が低下し細胞膜を介する Na 濃度勾配に変化がおこると, Na - Ca 交換機構を介して Ca の濃度勾配にも変化のおこることが考えられる。強心配糖体は, Na ポンプを強く抑制する作用を持つことから, 強心配糖体の心筋収縮力増強作用にこの Na - Ca 交換機構が関与しているのではないかの示唆がなされている。

平滑筋に対して強心配糖体は, 様々な作用を示すが, 血管平滑筋においては収縮作用, あるいは単独では収縮作用を示さない場合でも他の収縮薬による収縮を増強する作用をもつことが知られている。この作用機序については, 上記の Na - Ca 交換機構の関与を含め, いくつかの機序の関与が示唆されているが, まだ解明されていない。とくに, これまでの血管平滑筋における強心配糖体の研究においては, 内因性カテコラミンの関与が無視されていたという経緯があり, これまでに得られた成績は, 平滑筋細胞に対する直接作用以外

の要素を含んでいる可能性がある。さらにこれまでの研究においては、実験材料として用いられた動物あるいは血管平滑筋の部位が様々で、これら動物種差あるいは部位による反応の差についても検討する必要にせまられていたといえる。

1-2 強心配糖体

1-2-1 強心配糖体について

強心配糖体 (Cardiac glycoside) とは、キツネの手袋 (*Digitalis purpurea*, *Digitalis lanata* など), *Strophanthus gratus*, キョウチクトウ, オモト, スズラン, フクジュソウなどの葉や種子から抽出される配糖体で、心筋に対して収縮力を高めいわゆる陽性変力動作用 (positive inotropic action) を示す一群の薬物をいう。ジギトキシン (*digitoxin*), ジゴキシン (*digoxin*) およびウワバイン (*ouabain*)

) を代表とする。配糖体から糖を除いたものをアグリコン (aglycone) またはゲニン (genin) と呼び、ステロイド核を母体としている。

糖の結合の有無は、吸収、溶解性、作用の発現と持続、血清蛋白への結合能などを変える。すなわち、経口吸収、血清アルブミンとの結合および代謝は、脂溶性の高いものほど増大し、イオン化傾向の強いものほど減少する。ジギトキシンの経口吸収は非常によく、ジゴキシンはこれに次ぐ。ウワバインは水溶性が高く、経口吸収は悪いが、作用の発現が速く基礎的研究には最も頻繁に用いられる強心配糖体である。

1-2-2 強心配糖体の一般薬理作用

強心配糖体のおもな作用は、その名の示すとおり、心臓に対する効果である。その効果は、「変力動作用」、「変伝導作用」および「変周期作用」の3つに分けられる。

強心配糖体の作用の中では、心筋収縮力を高める作用（変力動作用）が強い。とくに収縮力の弱くなった不全心においてその効果は著しい。この効果は、一部内因性カテコラミンの β 作用が関与しているが、基本的には、心筋に対する直接作用によると考えられている。心筋の収縮も他の筋と同様、Caにより引き起されるが、このCa動態に強心配糖体が影響を与えることにより収縮力が高まるものと考えられている（1-2-4参照）。

一方、強心配糖体は、房室結節における興奮の伝導を抑制する（変伝導作用）。これには迷走神経の要素と、それ以外の直接作用とが関係するといわれている。

さらに強心配糖体は心拍数を減少させる。これはおもに洞房結節を支配する迷走神経の影響を高めるために引き起されると考えられている。

その他強心配糖体の作用としては、利尿作用が認められる。これは心拍出量が増加する

ことによつて、腎や脳下垂体の循環が改善され、アルドステロン、抗利尿ホルモンなどの分泌が減少することによる二次的なものである。

血圧に関しては、正常のヒトあるいは実験動物には影響しないが、心不全の動物に対して、あるいは中毒量の強心配糖体が投与された場合に、最高血圧と脈圧を上昇させる。

1-2-3 Na⁺;K⁺-ATPase と強心配糖体

興奮性細胞が反復興奮して外液のNa⁺がNa⁺チャンネルを介して流入し、また内液のK⁺がK⁺チャンネルを介して流出するとき、これらイオンの濃度勾配は減少し、細胞はいずれも興奮し得なくなる。しかし、生理的条件下では細胞内外のNa⁺およびK⁺の濃度勾配は一定に保たれ、細胞はその興奮性を維持しつづけている。

すなわち、興奮性細胞の細胞膜にはNa⁺をたえず細胞外へ排出し、これと共役してK⁺を細胞

内に取り込むポンプ機構が存在すると考えられてきた (Hodgikin - Huxley の Naポンプ説)。現在では, Na, K 濃度勾配は, 興奮性細胞のみならず, 非興奮性細胞にも存在することが認められている。

細胞膜における Na と K の共役輸送は, 赤血球を用いた実験で始めて見出されたが (Shatzmann, 1953), この共役輸送には ATP の存在が必要であることも同時に観察された。以後各種の細胞にこのようなイオン輸送機構が存在することが報告された (Skou, 1965; Schwartzら, 1975)。生理学的手法を用いて発見された Naポンプの存在とは別に, Skou (1957) は生化学的手法を用いて, カニの神経節のマイクロソーム分画に, Mg, Na および K の3者の存在下で活性を発現する ATPase を発見し, そしてこの ATPase が Naポンプの実体であると推定した。Post ら (1960) は, ヒト赤血球を用いて Naポンプと Na, K-ATPase の種々のパラメーターを比較し, 両者の性格が極めてよく類

似していることを証明した。現在では、この Na, K-ATPase が Na ポンプの実体であり、ATP を基質として Na と K を輸送する担体であることが確立されている。

Na, K-ATPase の反応機構についてはこれまで詳細に検討され、いくつかのモデルが提唱されているが、基本的には、以下のような機構が考えられている。

Na, K-ATPase は、2つのコンフォメーションで存在する。1つは、リン酸化していない E_1 で、Na と結合する部位は内側を向いている。これに Na が結合すると Mg-ATP によりリン酸化され、 E_2-P になる。 E_1 が E_2-P になるのに伴い Na 結合部位は外側を向き、Na がとれて K がつく。 K が E_2-P につくと、K 結合部位は再び内側に向き、加水分解されて E_2-P_i となる。 K は、内側に引き放され、再びサイクルが始まる。

しかし、Na と K の輸送は、1:1 で共役しているのではなく、3個の Na に対して2個の

Kが輸送されることが明らかにされている。このようにNaポンプによって細胞内からくみ出されるNaの数と細胞内へ取り込まれるKの数は一致しないので、このポンプの活動は、膜を介して電荷の移動を伴うことになる。

したがってNaポンプは、発電性 (electrogenic) であると考えられる。Naポンプが発電性であることは、興奮性組織を反復刺激することにより細胞内Na濃度を上げてNaポンプを活性化すると過分極が起ること、またK除去液で細胞内Na濃度を上昇させた後正常液にもどすと、計算されるK平衡電位よりも深い膜電位が得られることから明らかである (Thomas, 1972)。平滑筋におけるNaポンプも発電性であることが確認されている (Fleming, 1980; Widdicombe, 1981)。

Naポンプの存在は、Schatzmann (1953) により指摘されたが、彼は、この報告のなかに強心配糖体の一つであるウワバインがNaポンプを強く抑制する作用をもつことを同時に記載し

ている。現在では、強心配糖体はある条件下で Na,K-ATPase と極めて高い親和性で飽和的に結合し、この酵素活性を強く抑制することが明らかとなっている (Lee と Klaus, 1971; Skou, 1971)。すなわち強心配糖体は、上記の Na,K-ATPase のコンフォメーションのうち E₂-P の状態でよく結合する。

1-2-4 心筋に対する強心配糖体の作用

心臓に対する強心配糖体の作用のうち、変伝導作用および変周期作用については、その多くの部分は自律神経系を介した作用により発現することが知られているが (Gillis と Quest, 1980)、変力動作用については、心筋に対する直接作用が重要であるといわれている (Cattell と Gold, 1938; Gold と Cattell, 1940; Spann ら, 1966)。心筋の収縮も骨格筋と同様、最終的には細胞内の遊離 Ca 濃度により支配され

ている。しかし心筋の場合、骨格筋と比べて細胞内遊離Ca濃度は、多くの要因により変化することから、収縮機構（興奮-収縮連関）の解析が充分になされているとはいえない。したがって強心配糖体の作用機序の研究にも限界があり、不明な点が多い。

強心配糖体は、Na,K-ATPase を抑制する作用を持つことが生化学的に明らかにされていることから、強心配糖体の強心作用についてはNa,K-ATPase との関連において説明されることが多い（LeeとKlaus, 1971; Langer, 1973; LüllmannとPeters, 1974; AkeraとBrody, 1976; VanWinkleとSchwartz, 1976; AkeraとBrody, 1978; Noble, 1980）。現在、強心配糖体の作用機序については、Na,K-ATPase に対する抑制作用が強心効果と関連するという説、および作用部位はNa,K-ATPase であるが、Na,K-ATPase 抑制は、強心効果に関与しないという説に分かれ、現在でも論争が続いている。以下、この二つの仮説について述べる。

〔Na, K-ATPase 抑制説〕

強心配糖体の作用点がNa, K-ATPaseであり、Na, K-ATPase抑制が強心作用発現の原因だとする説は、強心配糖体の研究の歴史的背景から考えて中心的なものであると評価されよう。この説は、以下のような実験成績により支持されている。

- 1) 強心効果を示す濃度の強心配糖体を投与した心筋から調整されたNa, K-ATPaseは、中程度(20-40%)に抑制されている(Akeraら, 1969; Beschら, 1970; Akeraら, 1970)。
- 2) 外液K濃度の上昇は、強心配糖体のNa, K-ATPaseへの結合を抑制するが、同時に強心配糖体の強心効果も抑制する(Prindleら, 1971)。
- 3) 種々の強心配糖体のNa, K-ATPase抑制作用および強心作用の効力には差があるが、両者の間には相関関係が認められる(HaustenとHauptmann, 1974)。またNa, K-ATPase抑制作用を示さない強心配糖体は、強心作用を示さ

ない。

- 4) 強心配糖体の強心作用には種特異性が認められ、ヒト、イヌ、ネコは感受性が高く、モルモット、ウサギは中程度の感受性を示し、またラットやガマは低い (Repke ら, 1965 ; Akera ら, 1969 ; Allen と Schwartz, 1969)。そして、強心配糖体の Na, K-ATPase 抑制作用にも、同様に種特異性が認められ、両者の間には強い相関関係が認められる (Hausten と Hauptmann, 1974)。
- 5) 強心配糖体以外の物質で Na, K-ATPase 抑制作用を示す物質、たとえば、PCMB, N-エチルマレイמיד (NEM) , エタクリン酸, フッ化物, カサイン, ルビジウム, タリウムなども、強心配糖体と同様に強心作用を示す (Glynn, 1963 ; Skou と Hilberg, 1965 ; Duggan と Noll, 1965 ; Opit ら 1966 ; Ku ら 1974 ; Tobin ら, 1975)。

強心配糖体により心筋細胞膜の Na,K-ATPase が抑制されると、細胞内 Na 量は増加し、細胞内 K 量は減少すると考えられる。そして強心配糖体の強心効果は、Na の細胞内への流入を増大させるグラヤノトキシン (Na チャンネルの不活化の抑制) や電気刺激頻度の増大により増強されること、あるいは逆に、低 Na 液やテロドキシン (Na チャンネル抑制) により抑制されることから、強心配糖体の強心効果の発現には細胞内 Na 量の増加が必要であると考えられている。強心配糖体による細胞内 Na の増加は、後述の Na-Ca 交換機構を活性化し、細胞内遊離 Ca 濃度を高めることにより心筋の収縮力が増大する、と説明されることが多い。Na,K-ATPase 抑制を介さずに細胞内 Na 量を増大するといわれているグラヤノトキシン、ベラトリジン、Na イオノフォア (モネンシン) なども心筋の収縮力を増大させる作用を示す (Kuら, 1977 ; Honerjäger と Reiter, 1977 ; Sutko ら, 1977 ; Schlafer ら 1978 ; Kabell ら, 1979 ; Schlafer ら, 1980)。

〔Na,K-ATPase 抑制は関与しないという説〕

上記の Na,K-ATPase 抑制説は、これまで広く研究者に受け入れられてきた説であるが、最近になって Na,K-ATPase 抑制と強心作用は必ずしも平行せず、むしろ Na,K-ATPase 抑制は強心配糖体の中毒作用と関連するのではないかとの報告がなされるようになった (Okita, 1977; Lüllmann と Peters, 1974, 1979; Noble, 1980)。以下、Na,K-ATPase 抑制と強心作用は関連しない、とする仮説について述べることにする。

Bentfeld ら (1977) は、モルモットの心耳を用い、強心作用を示す低濃度のウワバインが組織 K 量をむしろ増加させ、組織 Na 量を減少させることを報告した。Godfraind と Ghysel - Burton (1977, 1979) もモルモット心耳を用いて同様の成績を得ている。さらに Cohen ら (1976) は、ヒツジのフルキン工線維の K 感受性逆転電位を測定して K の濃度勾配を推定する方法により、低濃度 (治療濃度) のウワバインが Naポンプ活性を促進することを示唆している。

また、Na選択電極を細胞内（ヒツジプルキン工線維）に挿入し直接細胞内Na濃度を測定した実験においても、低濃度の強心配糖体は細胞内Na濃度を増加させないという（Ellis, 1977; DeitmerとEllis, 1978; Leeら, 1980）。その他 ^{42}K を用いた実験でも、強心配糖体による ^{42}K 含量の変化と強心作用に時間的なずれのあることが報告されている（Gadsbyら, 1980）。

このような報告に対しAkeraら（1976, 1977）は、心筋活動電位1サイクル毎の一時的な細胞内Na濃度の増加（Naの経時的変化：Na transient）が重要であることを、コンピューターシミュレーションにより示唆し反論している。すなわち、強心配糖体による中程度（40%）のNaポンプ抑制下では、活動電位の初期のNa流入による細胞内Na濃度は対象と比べ15%程度増加するが、休止時には、このNaは低下した状態のNaポンプで完全にくみ出すことができるといふ。そして細胞内Naの蓄積は、Naポンプの60%以上が抑制された時に起こること

を示している。

以上のよろに, Na,K-ATPase 活性と強心作用は
かならずしも平行しないという報告がなされ,
強心効果と Na,K-ATPase 抑制が相関するといふ仮
説と対立している。このような実験成績のく
いちがいは, 用いた栄養液の K 濃度の差, あ
るいは電気刺激頻度の差など, 実験条件の違
いに由来している可能性も指摘されている (*Noble, 1980*)。しかし Na,K-ATPase 抑制と強心効
果は関連しないとすむ立場をとる説において
も, 強心配糖体の作用点は Na,K-ATPase であるとい
う点では一致している。

それでは, 強心配糖体はどのような作用に
より心筋の収縮力を増強すると説明するのだ
ろうか。Nayler ら (1973) は La により置換され
る Ca 分画, すなわち細胞膜表面と考えられる
部分の Ca 結合がウワバインにより増大するこ
とを報告している。Carrier ら (1974) も同様に
膜表面 Ca 結存量 (*fast exchanging Ca fraction*) がウワバイ
ンにより増大することを認めている。Gervais ら

(1977) は, Na,K-ATPase に接して存在するリン脂質に対する Ca 結合能がウワバインにより増大することを見出し, これにより細胞膜表面の Ca 濃度が増大して収縮力を増強するものではないかと考えている。Lüllman ら (1975) は, 分光学的研究 (円偏光二色性, circular dichroism) により, Na,K-ATPase を抑制しない濃度のウワバインが, 心筋より調整した細胞膜標本の蛋白質分子 (おそらく Na,K-ATPase) に構造変換を惹起することを見出し, この構造変換が Na,K-ATPase 分子の Ca 結合能の上昇と関連しているのではないかと推定している。

一方, いくつかの心筋細胞において, 脱分極時における Ca 電流がウワバインにより増大することが報告されているが (Dramane ら, 1971; Weingart ら, 1978; Marban と Tien, 1979), この現象は, 強心配糖体により膜表面の Ca 分画が増大するという成績と対応していると考えられる。Na,K-ATPase に対する強心配糖体の抑制作用に動物種差がみられるのと同様, 強心

配糖体の Ca 電流増強作用にも動物種差がみられ、両者がよく相関するという報告もある (Katz, 1972)。

1-2-5 平滑筋に対する強心配糖体の作用

平滑筋細胞膜に Na ポンプが存在することは、ウワバインあるいは K 除去液により細胞膜内外の Na および K の濃度勾配が減少すること (Widdicombe, 1981), あるいは細胞膜分画に, Na, K および Mg により活性化される ATPase が存在し, これがウワバインで抑制されることなどから明らかである (Hess と Ford, 1974; Wei ら, 1976; 山本と藪, 1979; Matlib ら 1979)。したがって平滑筋細胞においても, 細胞内を負とする細胞膜電位が存在し, 興奮性が維持されている。

ウワバインをはじめとする強心配糖体あるいは K 除去などによる Na ポンプ抑制は, 種々

の平滑筋において収縮作用，あるいは収縮抑制作用を示すことが知られている（Somlyo と Somlyo, 1970; Van Breemen ら, 1979; 砂野, 1980; 浦川と尾崎, 1981）。これらの作用は，動物種あるいは臓器種により著しく異なっており，また作用機序についても Na ポンプ抑制に伴って派生する種々の要因が想定されている。以下，平滑筋に対する強心配糖体の薬理作用の概要を臓器別に記述する。なお，Na-Ca 交換機構に関する報告については次章で詳しく述べる。

モルモット盲腸紐に対してウワバインは一過性の収縮を発生することが知られている（Schatzmann と Ackermann, 1961; Casteels, 1966; Matthews と Sutter, 1967; Shimo ら, 1968; Urakawa ら 1969; Ozaki ら, 1978）。この収縮は細胞膜の脱分極とスパイク頻度の増加に起因するもので，発電性 Na ポンプ抑制に伴う反応と考えられる。同様の作用は，回腸（Godfraind と Godfraind-deBecker, 1963; James と Roufogalis, 1977a, b; Shimizu ら,

1979) , 胃 (Dhba , 1975) などの平滑筋においても認められる。

一方, ウワバインはモルモット盲腸紐の高濃度K液による収縮を抑制することが知られている (Schatzmann と Ackermann , 1961 ; Pfaffman ら , 1965 ; Pfaffman と Holland , 1966 ; Karaki ら 1969 ; Urakawa ら 1970 ; Bose , 1975 ; Kishimoto ら , 1980) 。

このウワバインの収縮抑制作用は, Na除去液中ではみられないこと (Bose , 1975 ; Kishimoto ら , 1980) , および収縮抑制と細胞内Na量の増加がよく対応すること (Kishimoto ら , 1980) から, ウワバインによるNaポンプ抑制に伴う細胞内Na量の増加が盲腸紐の収縮機構を抑制する、と考えられている。

ラット, ウサギおよびネコの子宮平滑筋に対しても, Naポンプを抑制する濃度のウワバインが収縮作用を示すことが知られている (Daniel , 1964 ; Daniel ら , 1970) 。

一方, 精管に対してもウワバインは収縮を発生させ (Katsuragi ら , 1978 ; Urquilla ら , 1978) , あるい

は、Ca収縮を増強することが知られている（Katsuragi と Ozawa, 1978）。精管におけるこれらの作用は、 α 遮断薬のフェントラミンで抑制されることから、内因性カテコラミンの遊離によると考えられている。

血管平滑筋は循環器の一部を構成しており、したがって強心配糖体の作用に関する報告も数多い。強心配糖体は、動脈系および静脈系の平滑筋に対して収縮および収縮増強作用を示すことが知られている。これらの作用機序として 1) 内因性物質の遊離, 2) 細胞膜の脱分極, 3) Na - Ca 相互作用などの要因が考えられている。これらの要因の中では 3) が特に重要であると考えられている。血管平滑筋に対する強心配糖体の作用に関する詳細は、(1-3-2) で述べることにする。

1-3 Na - Ca 交換機構

1-3-1 Na - Ca 交換機構について

Caの作用がNaにより拮抗されることは種々の生体組織で認められているが、これは、NaとCaの原子半径が 0.95 \AA 前後で近似しているという物理化学的性格によるものと考えられている。「Na - Ca 交換機構」は、このNaとCaの拮抗関係が最も明確に反映した生体機構であり、多くの研究者の興味をひいてきた課題の一つである。現在では種々の臓器においてこのNa - Ca 交換機構の存在が示唆されている (Baker, 1972; Blaustein, 1974; Brinley, 1976; Blaustein, 1977b; Baker, 1978; Brinley, 1978; Reguena と Mullins, 1979; Langer, 1982)。

Na - Ca 交換機構の存在が提唱されたのは、Wilbrandt と Koller (1948) のカエル心筋を用いた研究がきっかけとなっている。彼らは、心筋

の収縮張力が外液 Na 濃度を減少することにより増大することを観察し、この張力の大きさが外液 Ca 濃度と外液 Na 濃度の自乗の比、すなわち $[Ca]_o / [Na]_o^2$ に従うことを見出した。

Lüttgau と Niedgergerke (1958) はこの現象をさらに詳細に検討し、質量作用の法則を適用して細胞表面の陰性基で 1 個の Ca と 2 個の Na が拮抗するモデルを考え、これが収縮を制御していると説明した。しかし当時はまだ筋収縮がトロポニンに Ca が結合することにより生ずることがわかっていない時期であり、上記の実験成績から細胞膜を介する Na と Ca の透過機構を考えるにはいたらなかった。

Reuter と Seitz (1968) は、モルモット心筋を用いて細胞内 ^{45}Ca の細胞外への流出が外液 Na 濃度の低下にしたがって減少することを観察した。つづいて Glitsch ら (1970) は、 ^{45}Ca の細胞内流入に対する細胞内 Na 濃度の影響を調べ、細胞内 Na 濃度が高いと ^{45}Ca 流入が促進されることを観察した。このよろに細胞膜を介する

Ca 輸送は，同側の Na はこれと拮抗し，対側に存在する Na により促進することが明らかとなった。心筋におけるこれらの研究と同時期に，Baker ら (1969) および Blaustein と Hodgkin (1969) は，イカおよびカニの巨大神経を用いてほとんど同様の現象を観察した。このようにして，細胞膜を介して Na と Ca を対側に輸送する Na-Ca 交換機構の理論が提唱されるにいたった (図 1)。

この理論によれば，細胞内外の Na と Ca 濃度の関係は $[Ca]_i / [Ca]_o = [Na]_i^2 / [Na]_o^2$ の式で示される。いま $[Ca]_o = 1.2 \text{ mM}$ ， $[Na]_o = 150 \text{ mM}$ ， $[Na]_i = 10 \text{ mM}$ とすると $[Ca]_i$ は $5.3 \times 10^{-6} \text{ M}$ と計算される。すなわち細胞内の Ca 濃度勾配は，Na 濃度勾配の自乗倍に保たれることになる。このように，Na-Ca 交換機構は，Na 濃度勾配をエネルギー源として利用し細胞内 Ca 濃度を低く保ち，Ca 排出機構としての役割を担っていることが考えられ，注目されている。すなわち，このポンプ機構は，Na,K-ATPase あるいは Ca-

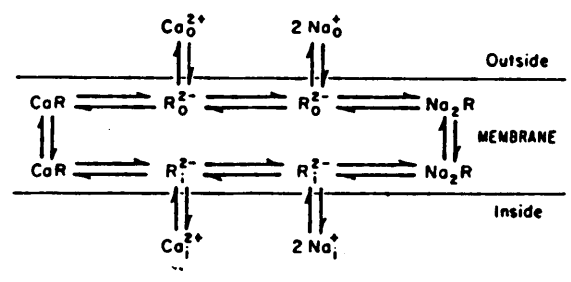
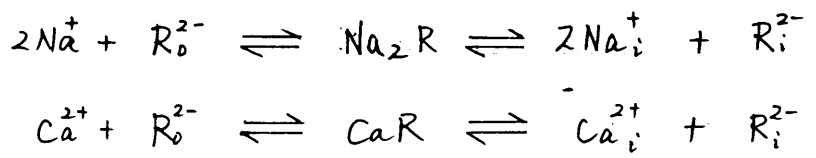


図 1 . Na - Ca 交換機構のモデル。

膜表面で Na^+ と Ca^{2+} が負 (2 価) に帯電した担体 (R^{2-}) に拮抗すると考える。これを式に示せば



ここで Na^+ , Ca^{2+} の R^{2-} に対する親和性は、細胞膜の両側では等しいと考える。

$$[\text{Ca}^{2+}]_o \times [\text{R}^{2-}]_o = [\text{Ca}^{2+}]_i \times [\text{R}^{2-}]_i$$

$$[\text{Na}^+]_o^2 \times [\text{R}^{2-}]_o = [\text{Na}^+]_i^2 \times [\text{R}^{2-}]_i$$

以上により
$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_o}{[\text{Na}^+]_o^2} = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_i}{[\text{Na}^+]_i^2}$$

すなわち、細胞内 Ca 濃度は、細胞内 Na 濃度が一定に保たれているとすれば $[\text{Ca}^{2+}]_o / [\text{Na}^+]_o^2$ の比に従うはずである。

ATPase (4-1-4 参照) のように直接 ATP を消費してイオンを輸送するのではなく, Na,K-ATPase により作られた Na 濃度勾配をエネルギー源として利用するところに特色がある。

1960 年代までは, Na と Ca の交換比は 2:1 であり, この系は正味の電荷を運ばず電氣的に中性 (electroneutral) であると考えられてきた。

しかし, イカ巨大神経において Blaustein (1976) は, Na - Ca 交換輸送が膜電位変化により影響を受けることを見出し, また, ^{45}Ca 流出の速度論的解析からも, 交換比が 3:1 に一致すると結論した (Blaustein, 1977a)。Mullins と Brinley

(1975) もイカ巨大神経を用いて, Na - Ca 交換機構が電氣的に中性ではないことを報告している。他方心筋においても, Na - Ca 交換機構は発電性であり Na と Ca の交換比が 3:1 に近いことが示唆されている (Pitts, 1979; Horackova と Vassort, 1979; Wakabayashi と Goshima, 1981a;

Coraboeuf ら, 1981)。ところで, 前述の Na,K-ATPase は, Na と K の交換比が 3:2 で発電性であるが,

Na - Ca 交換における Na と Ca の交換比が 3:1 であるならば、両ポンプが同時に働くことにより正味の電荷の動きはなくなることになる。

1-3-2 平滑筋における Na - Ca 交換機構の研究

以上述べたように、Na - Ca 交換機構に関する研究は、心筋や神経細胞において精力的に行なわれ、その存在はほぼ確立されているといつてよい。平滑筋においてもこの機構が存在するのではないかと疑問が持たれ、これまでに多くの研究者により研究がなされてきた。

平滑筋の収縮は、細胞内の遊離 Ca 濃度の上昇と対応していることから、平滑筋において Na - Ca 交換機構を研究する場合、細胞内外の Na 濃度勾配の変化が、いかに収縮反応に影響するかが重要な問題となる。Na 濃度勾配を変化させるものとしては、強心配糖体の適用あるいは外液からの K 除去などにより Na ポンプ

を抑制する方法と，外液のNaを他の物質に置換する方法が用いられる。これらの因子が収縮作用を示す場合，あるいは収縮薬による収縮を増強する場合，少なくとも以下に示すNa-Ca交換機構以外の要因について考慮しなくてはならない。

- 1) 内因性物質（各種伝達物質，プロスタグランジンなど）の遊離を介する収縮反応。
- 2) 膜電位の変化。多くの細胞におけるNaポンプは電気発生性であり，またポンプ自体がK平衡電位を形成しているので，Naポンプの抑制は細胞膜を脱分極する可能性がある。またNa除去を行なう場合，用いる置換物質の種類により膜電位は複雑に変化する。
- 3) 細胞内小器官（筋小胞体，ミトコンドリアなど）のCa結合能あるいはCa取り込み能などへの影響。

これらの要因を考慮したうえで，具体的な研究の経緯について，血管平滑筋およびその

他の平滑筋に分けて述べることにする。

〔血管平滑筋について〕

ストロファンチジン，ウワバインなどの強心配糖体が，電気刺激，Kあるいは薬物による収縮を増強することは，種々の血管平滑筋において報告されている (Leonard, 1957; Matthews と Sutter, 1969; Bohr ら 1969; Brender ら, 1969, 1970; Toda, 1972)。また栄養液からのNa除去が，強心配糖体と同様各種の収縮を増強することも報告されている (Leonard, 1957; Bohr ら, 1969; Toda, 1972)。さらに数種の平滑筋においては，ウワバインあるいはK除去液が一過性に収縮作用を示すことが報告されている (Briggs と Shibata, 1966; Friedman ら 1972; Reuter ら, 1973; Blaustein, 1977b)。このよるなNa濃度勾配を減少させる因子による収縮あるいは収縮増強作用に，Caが関与していることは当然考えられるが，少なくとも1969以前の報告においてはこれらの現象に対

し明快な説明はなされていなかった。

前節 (1-3-1) においてすでに述べたように、心筋および神経組織において Na - Ca 交換機構の存在が提唱されたのを契機に、平滑筋にもこの機構が存在するのではないかとの疑問が持たれ、上述の強心配糖体、K 除去および Na 除去の作用に Na - Ca 交換機構が関与している可能性が示唆された (Bohr ら, 1969; Friedman ら, 1972)。

血管平滑筋における Na - Ca 交換機構に関する体系的な研究は、Reuter ら (1973) により始めてなされた。彼らは、ウサギ大動脈および肺動脈を用い、Na 除去 (蔗糖, コリンおよび Li 置換) が筋を収縮させ、しかもその収縮の大きさは $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比にほぼ従うことを示した。またウワバインや K 除去液でも筋縮が発生することを明らかにした。さらに ^{45}Ca 流出に対する外液 Na の影響についても検討し、外液 Na に依存する Ca 流出の分画が存在することを報告している。

一方、血管平滑筋標本において、交感神経終末は平滑筋層である中膜には殆ど存在せず、外膜との境界に分布するといわれている。しかし、これまで紹介してきた論文の大部分が、この神経終末に対する各種因子の作用を考慮していなかった。1977年、KarakıとUrakawaは、ウサギ大動脈について、ウワバイン、K除去液およびNa除去液（蔗糖、トリスおよびLi置換）により発生する一過性の収縮、さらにこれらの因子によるノルエピネフリン収縮の増強効果が、 α 遮断薬の適用、交感神経終末のカテコラミンの涸渇薬であるレセルピソンの処理および外膜を除去することによる機械的除神経で消失することを報告した。さらにBonaccorsiら（1977）は、イヌ腸間膜動脈およびラット尾動脈、大腿動脈を用い、K除去液による収縮が α 遮断薬で消失すること、さらにトリチウム（ ^3H ）標識ノルエピネフリンの遊離がK除去液で促進することを報告した。

このように、これまでNa濃度勾配を減少さ

せる因子は、平滑筋に直接働いて収縮を発生させると考えられてきたが、実は前述の Reuter ら (1973) の研究も含めて、内因性カテコラミンの作用を介してもたらされていることが明らかにされた。

〔その他の平滑筋について〕

血管平滑筋以外の平滑筋における研究のほとんどは、モルモット盲腸紐を用いて行われている。

Katase と Tomita (1972) は、実験において予め盲腸紐を Na を含まぬ高濃度 K 液で収縮させ、ついで K を 5.9mM にもどすが、このとき残りの K を蔗糖で置換した。このとき膜電位は元のレベルに戻るが弛緩はおこらず、わずかの Na (5mM) を添加すると弛緩することが観察された。このことは、内向きの Na 流入が Ca の流出を促進することを意味し、Na-Ca 交換機構が存在する可能性を示唆したといえる。Ma と Bose (1977) は、盲腸紐において、D600 や

Caキレート剤 (EGTA) によるK収縮の弛緩がNa除去液 (蔗糖置換) 中で抑制されること, またNa除去液中で ^{45}Ca 量 (La分画) が増加していることを見出し, KataseおよびTomita (1972) らの見解を支持している。

Brading と Widdicombe (1975) は, 盲腸紐にK除去液中で ^{24}Na を負荷し, その後Na除去液中 (dimethyl-diethanol-ammonium-chloride置換) での ^{24}Na の流出に対する外液Caの影響を検討したが, 外液Caは濃度依存性に ^{24}Na の流出を促進することを観察した。さらにNa負荷をした筋のNa除去液中からの ^{47}Ca 取り込み (La分画) を測定しているが ^{47}Ca 取り込みは細胞内Na量に依存していた。Brading (1978) はさらに収縮反応の成績を加え, モルモット盲腸紐におけるNa-Ca交換機構の存在を支持している。BurtonとGodfraind (1974) は, モルモット回腸において, ウワバインおよび低カリウム液中で ^{45}Ca 取り込みが増大することを報告している。

以上紹介した報告は, 盲腸紐におけるNa-

Ca 交換機構の存在を支持しているが、これを否定する見解も示されている。Raeymaekerら(1974)は、盲腸紐の ^{45}Ca 流出が蔗糖置換液中で抑制されるが、これはいつたん 100°C で加熱した筋においてもみられ、したがってこの Na 依存性の ^{45}Ca 流出は細胞膜を介するものではなく、細胞膜表面などの Ca 結合部位からの遊離をみたものではないかと述べている。

Casteels と van Breemen (1975) は、同じくモルモット盲腸紐を用いさらに検討を加えた。彼らは、まず La 法による ^{45}Ca 取り込みにおける Na あるいは K 除去液の影響を検討しているが、Na 除去 (コリン, Li 置換) は ^{45}Ca 取り込みを増加させるが、K 除去はこれに影響しないことを観察している。盲腸紐の ^{45}Ca 流出は、イカ巨大神経の場合と同様、代謝抑制により増加するが、この流出をコリン置換液は抑制し、Li 置換液はむしろ増加させた。さらに筋を 0°C から 35°C に再加温したときの細胞内 ^{45}Ca 量 (La 分画) の減少に対する Na 除去の影響につい

ても検討しているが、Li置換でこの減少が多少抑制されるが、トリス置換は影響しなかった。以上の成績の一部は、Na-Ca交換機構の存在をむしろ支持すると思われるが、彼らはこれを否定し盲腸紐におけるCa排出機構としてATP依存性のCaポンプの重要性を強調している。

以上述べてきたように、平滑筋におけるNa-Ca交換機構の存在の有無については、まだ統一された見解はない。特に血管平滑筋については、収縮反応における内因性物質の関与についての見落としがあり、十分な知見が得られているとはいえない。

平滑筋にNa-Ca交換機構が存在することを明らかにするには、1) 細胞内Na依存性のCa流入、2) 細胞外Na依存性のCa流出

3) 細胞内Ca依存性のNa流入、4) 細胞外Ca依存性のNa流出の4項目について証明すればよいことになる。しかし平滑筋細胞は細

胞容積が小さく、純粋に細胞膜を介するイオン動態を追跡することは困難である。例えば⁴⁵Ca流入を測定する方法として「La法」が開発されたが、この方法により測定されるCa量は、大部分が細胞内結合型のCaであり、この分画の増減のみをもつてCa流入の増減を論ずることは問題がある（2-5参照）。また、⁴⁵Ca流出を測定する際も、平滑筋の場合は、Caの流出曲線の明確な分画解析を行なうことは難しい。Na動態の測定に関しても、Caと同様多くの問題をかかえている（2-6参照）。しかし平滑筋を実験材料とする場合、張力変化を測定することにより細胞内遊離Ca濃度を推定することができるという利点もある。

1-3-3 本研究の目的

このよな知見の上になつて、本研究では、血管平滑筋の張力、Na、KおよびCa動態に対する強心配糖体の薬理作用に関する研究を行

なつた。実験をすすめるにあつては、特に Na - Ca 交換機構に関する問題を中心に検討を行なつた。実験材料としては、摘出臓器の研究に通常用いられているウサギ、モルモットおよびラットより摘出した各種の血管平滑筋を用いて比較した。強心配糖体としては、水溶性かつ速効性を有するウワバインを用いたが、強心配糖体と同様に Na ポンプを強く抑制する K 除去液の作用についても検討を加え、ウワバインの作用と比較した。さらに Na 除去液の収縮、Na および ^{45}Ca 動態に対する作用についても検討を加えた。

2 実験材料および方法

2-1 実験材料

実験動物として、雌雄のモルモット（300～400g）、ラット（200～400g）およびウサギ（2～3kg）を用いた。モルモットおよびラットは、頭部を強打して失神させ、頸部の血管をハサミで切断して放血致死させた。ウサギは、耳介静脈から空気またはペントバルビタールナトリウムを急速に注入し、致死させた。各部位の血管は、眼科用小ハサミを用いて脂肪組織ならびに結合組織が付着せぬよう切り離し、栄養液中に移した。標本作製は室温で行い30分以内に終了させた。一部の標本は、冷蔵庫中（4～6℃）に保存し、24時間以内に実験に使用した。冷蔵保存により収縮性の変化は認められなかった。

張力測定においては、Furchgott（1960）の方

法に従いラセン状糸片を作製した。大動脈糸片の作製は肉眼で行い、巾約3mm、長さ約10mmとした。ウサギ大腿動脈、後耳介動脈、腎動脈、モルモットおよびラット大腿動脈のラセン状糸片作製は、実体顕微鏡下で行い、巾約1mm、長さ約7mmとした。モルモットおよびラットの門脈は、縦に切断して管腔を露出した後、縦方向の張力を測定した。

組織イオン含量 (Na, K, Liおよび ^{45}Ca) の測定には、各血管を縦に切断し管腔を露出させた後、3~10mgの標本を作製し使用した。

2-2 外膜除去標本の作製

ウサギ大動脈を用いた一部の実験においては外膜を除去し機械的除神経を行った。その方法は、Maxwellら(1968)の方法を改良したKarakiとUrakawa(1977)の方法に従った。血管組織において交感神経終末は平滑筋層であ

る中膜にはほとんど存在せず外膜との境界に分布しているといわれ (Vanhoutteら, 1981), ウサギ大動脈より外膜部を除去すると, 経壁電気刺激, あるいはカテコラミン遊離作用を持つチラミンによる収縮の消失することが報告されている (BevanとVerity, 1976)。さらに最近, ウサギ大動脈において, 外膜が薬物透過の障壁になり, 収縮反応を遅くしていることも報告されている (RuffoloとPatil, 1979)。本研究においても, 外膜除去により, チラミンによる収縮が消失すること, ならびに高濃度Kあるいはノルエピネフリンによる収縮の潜伏期が短くなることを確認した。

2-3 栄養液の調製

正常液としては, 以下の組成の修正タイロイド液を用いた。

NaCl	136.8 mM
------	----------

KCl	5.4	mM
CaCl ₂	2.5	"
MgCl ₂	1.0	"
NaHCO ₃	11.9	"
glucose	5.5	"

K除去液およびCa除去液は、正常栄養液よりKおよびCaを除去して作製した。一部のCa除去液には、溶液中に存在する微量のCaを除去するためCaキレート剤であるEGTA (0.1 mM) を加えた。Na除去液は、正常栄養液中のNaClを蔗糖、塩化コリンあるいはLiClと等浸透圧になるよう置換して作製した。塩化コリン置換を行う場合には、アトロピン ($10^{-6}M$) を溶液中に添加した。高濃度K液は、正常栄養液中のNaClを等モルのKClと置換するか、あるいは2MのKCl溶液を高張性に適当量加えることにより作製した。

実験は、通常37°Cで行い、上記の栄養液には95%酸素、5%二酸化炭素ガス組成の混合気体を通気し、pH 7.2とした。

2-4 張力記録法

平滑筋標本の一端は、絹糸でガラスホルダーに結びつけ、これを容量20 mlのマグナス槽に入れた。標本の他端に結んだ絹糸は、歪圧力計（日本光電工業：SB-ITまたはTB-611T）に装着した。筋をマグナス槽に入れて10～15分後に約1 gの静止張力をかけた。筋の張力は歪圧力計から前置増幅器（日本光電工業：AP-620GまたはRP-3）を介し、インク書き記録計（日本光電工業：RJG300B，横河電気：Type 3056または大倉電気：D-2R）に記録した。

2-5 ^{45}Ca 動態

平滑筋細胞において、細胞外液中のCa濃度が $(1.5 \sim 2.5) \times 10^{-3} \text{M}$ であるのに対し、細胞内遊

遊離 Ca 濃度は静止時では $10^{-8} \sim 10^{-7} M$, 張力発生時では $10^{-5} \sim 10^{-4} M$ であるといわれる (Filoら, 1972 ; Endoら, 1977 ; Itoら, 1981) 。一方, 血管平滑筋組織に占める細胞間隙量の割合は, 標本の種類により異なるが, 50 ~ 60 % といわれている (Weiss, 1977) 。さらに, 細胞内小器官 (筋小胞体, ミトコンドリア・核など) には Ca の結合能あるいは取り込み能があり, また, 細胞表面にも陰性基が存在して Ca を結合しているといわれる。したがって組織全体の Ca 量を測定しても, その大部分は細胞外の Ca 量および細胞内外のある部位に結合している Ca 量を測定していることになる。

平滑筋細胞内の遊離 Ca 量を直接測定することは現在の技術では困難であるが, これまで細胞内 Ca をできるだけ保存したままで細胞間隙中の Ca を除去する方法が工夫されてきた。Briggs (1962) は, ウサギ大動脈に ^{45}Ca を取り込ませた後, 筋を栄養液で 10 ~ 15 分間洗浄することにより細胞間隙中の ^{45}Ca を除く試みを

行った。一方、浦川らのグループは、モルモット盲腸紐を用いた実験で、一定時間組織に ^{45}Ca を取り込ませた後、アイソトープを含まぬ栄養液で短時間（4分間）組織を洗浄し、残った ^{45}Ca 分画を「tightly bound fraction (TBF)」と名付けた（唐木ら、1972）。彼らは、各種の収縮薬によるTBF量の変化と、張力変化がよく対応していることを報告している。また、Van Breemenら（1972）は、細胞膜表面の陽イオン結合部位に強い親和性を持つ3価の陽イオンのランタン（La）に着目した。彼らは、組織に ^{45}Ca を取り込ませた後、Laを含む栄養液で筋を洗浄すると、細胞内由来と考えられる ^{45}Ca の流出が抑制され、かつ細胞膜表面に結合していると考えられる ^{45}Ca が除去されることを示し「La法」と名付け、これを細胞内Ca量の指標とした。「La法」は、その後多くの研究者に受け入れられ利用された。しかしこの「La法」の一つの欠点は、Laを含む洗浄液中においてもかなりの量の細胞内Caの漏出が

あることで、この漏出を防止するためいくつかの改良法が考案された。最近 Deth (1978) は、La液による筋の洗浄を低温下で行うと、 ^{45}Ca の流出速度がかなり抑制されることを報告した。他方、Godfraind (1976) は La濃度を原法の 2 ~ 10 mM から 50 mM まで引き上げ、洗浄時間を原法の 45 ~ 60 分から 5 分に短縮することを提唱した。さらに Karaki と Weiss (1979) は、低温という条件に加え La濃度を極端に高くすると (栄養液中のすべてのイオンを LaCl_3 で置換)、 ^{45}Ca の流出はほぼ完全に抑制され、細胞膜表面の ^{45}Ca も除去されることを報告した。

平滑筋にある処置を行い、これによつて細胞内の ^{45}Ca 分画が増大した場合、その原因としては、1) Ca流入の増大、2) Ca流出の減少、および 3) 細胞内 Ca 結合能の増大、が考えられる。例えば血管平滑筋において、高濃度 K液は、La法で測定した ^{45}Ca 分画を増大させることがよく知られている (

唐木, 1981)。この増大は, グラパミルなどの有機Ca拮抗薬で抑制されることから, 細胞膜を介する ^{45}Ca の流入が増大したことが原因と考えられる。しかし, 収縮反応から, 高濃度K液と同様にCa流入を増大させる作用をもつと考えられるノルエピネフリンによつては ^{45}Ca 分画の増加は認められない。一方, 高濃度K液の細胞内 ^{45}Ca 分画に対する増加作用は, 収縮に対し抑制作用を示さない濃度の各種のミトコンドリア阻害剤や, 嫌気条件により抑制されることから, 高濃度K液により細胞内に流入したCaはミトコンドリアに蓄積されるものと考えられている (Karaki と Weiss, 1981C; Karaki ら, 1982)。すなわち, La分画はミトコンドリアの機能の亢進あるいは低下によつても著しい影響を受けることが予想される。

以上のことから, 平滑筋組織においては, La法により ^{45}Ca 取り込みを測定し, その量的な変化を測定してもそれだけで細胞膜を介するCa動態を知ることにはならないといえる。

現在の段階においては⁴⁵Caを用いた実験はあくまで補助的なものと考えらるべきであつて、細胞膜を介するCa動態については、種々の収縮反応と対応させることにより、総合的に判断することが望まれる。

本研究における⁴⁵Ca取り込みの実験は、このKarakiとWeiss(1979)の方法(以下「低温La法」と略す。)に従い、以下のごとく行つた。血管平滑筋条片の重量をあらかじめ測定した後、ガラス製のホルダーに固定し、37°Cに加熱した正常栄養液中に少なくとも2時間以上放置した。続いて各種の前処置を行い、⁴⁵Ca(1~5 μ Ci/ml)を含む試験液中で、組織に⁴⁵Caを取り込ませ、0.5°CのLa液(LaCl₃ 73.8 mM, ブドウ糖 5.5 mM, トリス 11.9 mM, PH 7.2)で60分間洗浄した。つづいて、標本を組織溶解剤(Soluen 350, Packard 0.5 ml)を含むシンチレーションバイアルに移し、55°Cで一晩放置した。組織が完全に溶解したのを確認した後、塩酸を加えて中和し、さらにシンチレータ(Insta-

Gel, Packard) を加え, 液体シンチレーション計測器 (Tri-Carb 3380, Packard) で放射活性を測定した。

2-6 細胞内 Na および K 量の測定

平滑筋細胞も, 他の興奮細胞と同様, 細胞膜に存在する Na ポンプの働きにより, 細胞内 Na 濃度は細胞外 Na 濃度に比べ低く保たれている。組織 K 量については, その大部分が細胞内に存在すると考えられるので問題は少ないが, Na の場合は, Ca の場合と同様に, 組織全体の Na 量を測定しても, そのままで細胞内の Na 量を表わすことにはならない。本研究においては, 細胞内 Na 量を測定する方法として, 「低温 Li 法」 (Friedman, 1974) を用いた。「低温 Li 法」の理論的な背景は, 細胞内 ^{45}Ca 取り込みの方法として先に述べた「低温 La 法」 (Karakci と Weiss, 1979) に似ている。Friedman は,

ラット尾動脈を用いた実験で、組織をLi置換した栄養液（0℃）で洗淨すると、細胞内に由来すると考えられるNaの流出（slow component）が、低温により著しく抑制されることを見出した。さらに、細胞表面に結合しているNaも外液のLiと置換されることを観察している。したがって組織を低温Li液で適当時間洗淨することにより、細胞内Na量を測定することができるとを示唆した。Kishimotoら（1980）は、モルモット盲腸紐を用いた実験で、Friedmanの方法をさらに詳しく検討し、細胞内Na量の測定方法としてこれがきわめて有用な方法であることを報告している。本研究においても、モルモット大動脈を用い、Li液中におけるNaの流出が、低温条件下で抑制されることを認められた（図2）。

実験は、Friedman（1974）の方法を多少修正し、以下のごとく行なった。3~10mgの血管平滑筋条片を作成し、ガラスホルダーに固定して正常養液中に少なくとも2時間以上放置し

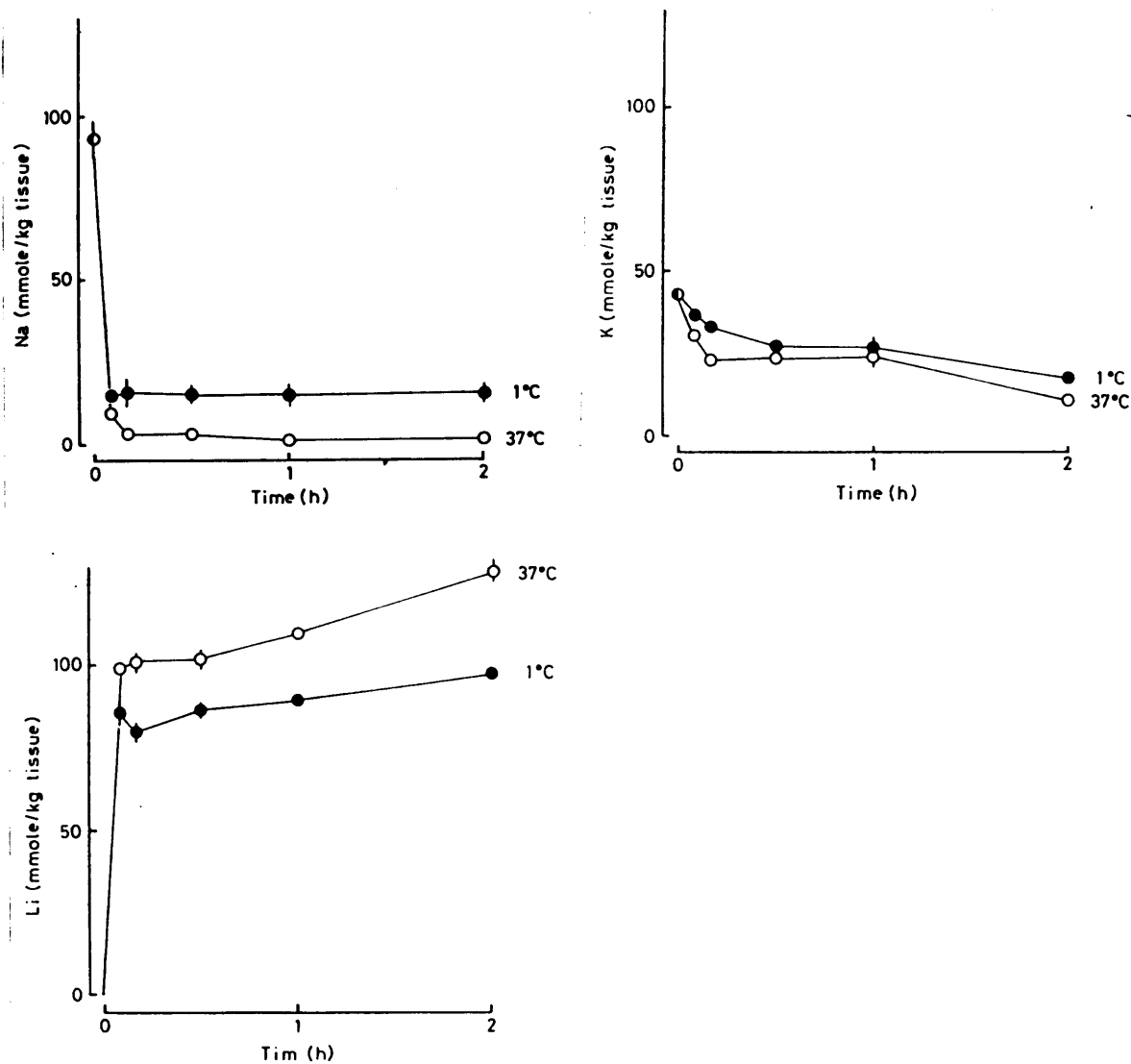


図2。モルモット大動脈における「低温Li法 (Friedman, 1974)」の検討。

Li液 (0.5°C および 37°C) 中における, 組織 Na, K および Li量 の経時変化を示す。縦軸: 組織 Na, K, Li量 (mmol/kg)。横軸: 時間 (h)。n = 6。

た。各種の試験液で処理した標本は、低温Li液 (LiCl 147.4 mM, フドウ糖 5.5 mM, トリス 11.9 mM) (05°C) (PH 7.2) で15分間洗浄した後組織重量を測定し、石英試験管に移した。つぎに石英試験管に硝酸 (61%) および過塩素酸 (60%) の等量混合液を0.5 ml ずつ加え、これをドライブロック (Technique DB-3 および 4) で加熱 ($180\sim 250^{\circ}\text{C}$) して組織を灰化させた。石英ガラスから溶出する微量のNaおよびKを考慮し、同一条件でブランクを作製した。測定直前に0.01Nの塩酸を含む希釈液4 mlを入れて灰化物を溶解し、溶液のNaおよびK濃度を蛍光光度計 (日立 Type 208) を用いて測定した。燃焼中、イオン化による干渉現象をさけるため、希釈液および標準液には CsCl (1000 ppm) を加えた。

2-7 供試した薬物

無機試薬： NaCl , KCl , CaCl_2 , LiCl ,
 MgCl_2 , LaCl_3 , NaHCl_3 , BaCl_2 , SrCl_2 , HCl ,
 HNO_3 , HClO_4 , CsCl , RbCl (以上特級試薬)

有機試薬： ウワバイン (*ouabain*) (Merck),
 テトラエチルアンモニウム (*tetraethylammonium-Cl*)
 (TEA) (東京化成), チラミン (*tyramine*)
 (sigma), ノルエピネフリン (*L-norepinephrine bitartelate*) (和光純薬), ジルチアゼム (*diltiazem*) (田辺), ニフェジピン (*nifedipine*) (Bayer), ニトロプルシドナトリウム (*sodium nitroprusside*) (和光純薬), ベラパミル (*verapamil*) (エーザイ), パパベリン (*papaverine hydro-chloride*) (Sigma), アトロピン (*atropine sulphate*) (東京化成), テトロドトキシン (*tetrodotoxin*) (三共), トリペレナミン (*toripele-*

nnamine) (Ciba Geigy), グリコールエーテルジ
アミン四酢酸 (glycol ether diamine tetracetic acid) (EGTA) (ドウタイド), トリスハイドロキシ
メチルアミノメタン (tris-hydroxymethyl-aminometane) (Merck), 塩化コリン (choline-chloride) (和光
純薬), 蔗糖 (sucrose) (和光純薬), ブドウ
糖 (glucose) (和光純薬)

2-8 統計処理

実験成績は平均値±標準誤差 (SE) で示した。有意差は Student-t test により、5% (*) および 1% (**) の有意水準で判定した。

3 実験成績

3-1 各種血管平滑筋に対するウワバイン およびK除去液の収縮作用

本節においては、各種実験動物から抽出した各種部位の血管平滑筋に対するウワバインおよびK除去液の収縮作用について、一般観察を行った。さらに細胞内Na量の変化と収縮との対応を検討し、各動物間の差異を比較した。

3-1-1 ウワバインの収縮作用

ウサギ、モルモットおよびラットの各種血管平滑筋に対するウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) の収縮作用を検討した (図3)。ウサギ大動脈にウワバインを作用させると、約30分の潜伏期間の後一過性の張力が発生し、さらに5~6

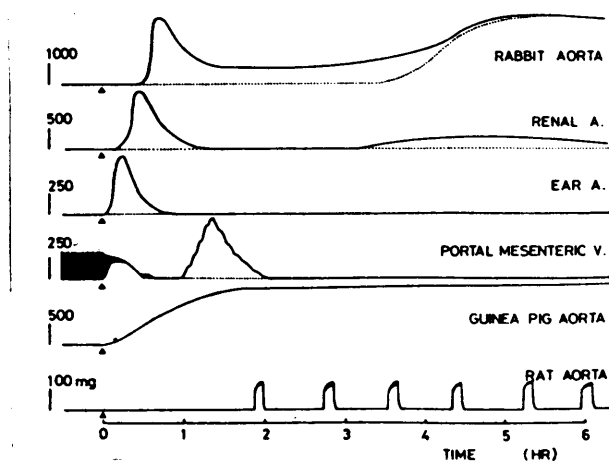


図3. ウサギ大動脈，腎動脈，後耳介動脈および門脈，モルモット大動脈およびラット大動脈に対するウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) の収縮作用。

破線はフェントラミン ($10^{-6} M$) 存在下の収縮曲線を示す。

時間後に最大となる緩徐な立ち上りの持続性の収縮が発生した。前羊の一過性収縮は、 α アドレナリン作働性遮断薬であるフェントラミン ($10^{-6}M$) で完全に抑制された。外膜を除去し、機械的除神経を行なったウサギ大動脈においては、フェントラミン存在下と同様の収縮曲線が得られた。ウサギ腎動脈およびウサギ耳介動脈でも一過性の収縮が見られたが、これも、フェントラミンにより完全に抑制された。ウサギ門脈は、動脈平滑筋とは異なり律動性の収縮を発生させたが、ウワバインを適用すると静止張力の上昇とともにこの律動性収縮は抑制された。ウワバイン適用約1時間後に一過性の張力が発生したが、これはフェントラミンで抑制された。

モルモット大動脈においては、ウワバインを適用して10~30分の潜伏期の後、持続性の張力が発生した。一部の標本においては、フェントラミン ($10^{-6}M$) の適用によりわずかな張力抑制が認められた。

ラット大動脈においては，ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) の適用により静止張力の変化は認められなかったが，一部の標本において，小さな律動性の収縮が観察された。さらに高濃度 ($10^{-3} M$) のウワバインを適用すると持続性の張力が発生した。これはフェントラミン ($10^{-6} M$) によりほとんど抑制されなかった。

3-1-2 K 除去液の収縮作用

ウサギ，モルモットおよびラットの各種血管平滑筋に対する K 除去液の収縮作用を検討した (図 4, 5, 6)。ウサギ大動脈，耳介動脈および腎動脈に K 除去液を作用させると，一過性の収縮発生の後，小さな持続性の収縮が発生した。フェントラミン ($10^{-6} M$) 存在下では，一過性の収縮は消失し，小さな持続性の張力が発生したが，これはフェントラミンで完全に抑制された。

モルモット大動脈および大腿動脈において，

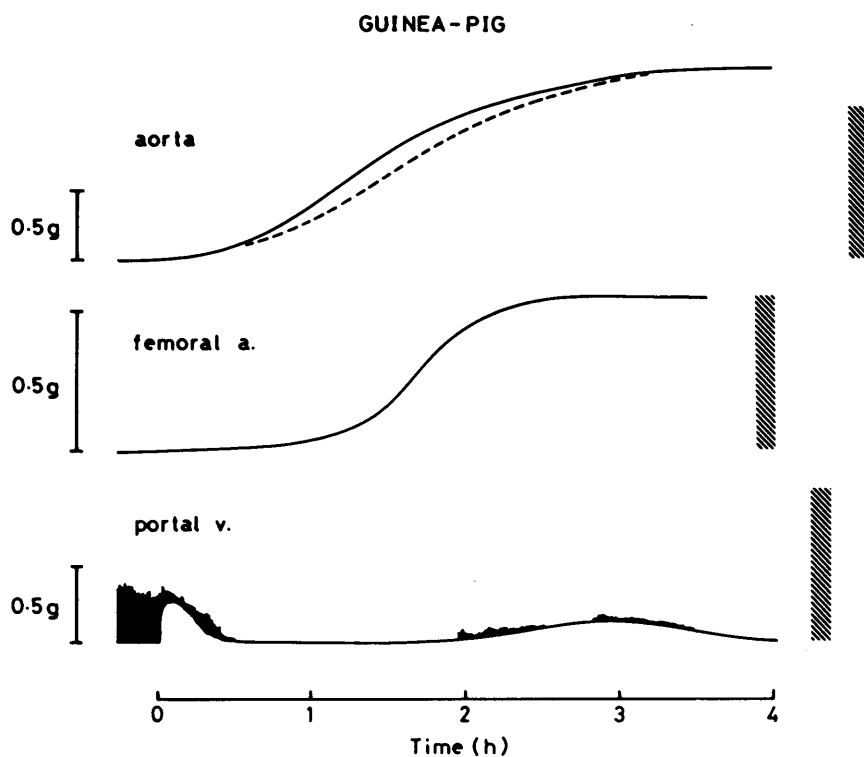


図4. モルモット大動脈, 大腿動脈および門脈におけるK除去液の収縮作用。

破線はフェントラミン ($10^{-6}M$) 存在下の収縮曲線を示す。右側の斜線のコラムは高濃度K液 ($65.4mM$) による収縮の大きさを示す。

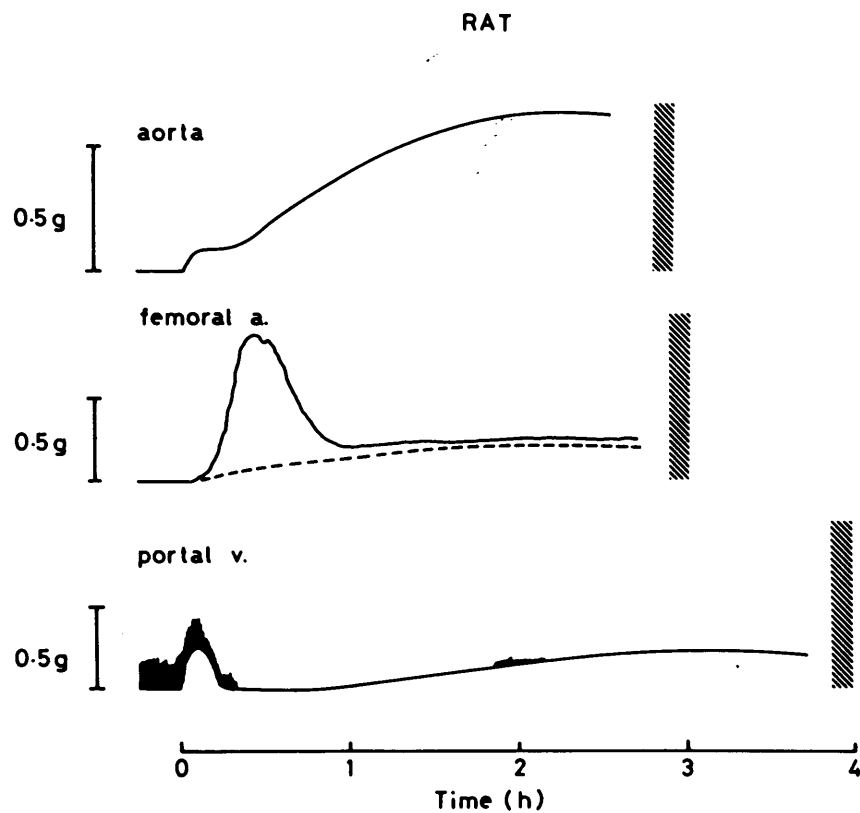


図 5. ラット大動脈, 大腿動脈および門脈
における K 除去液の収縮作用。

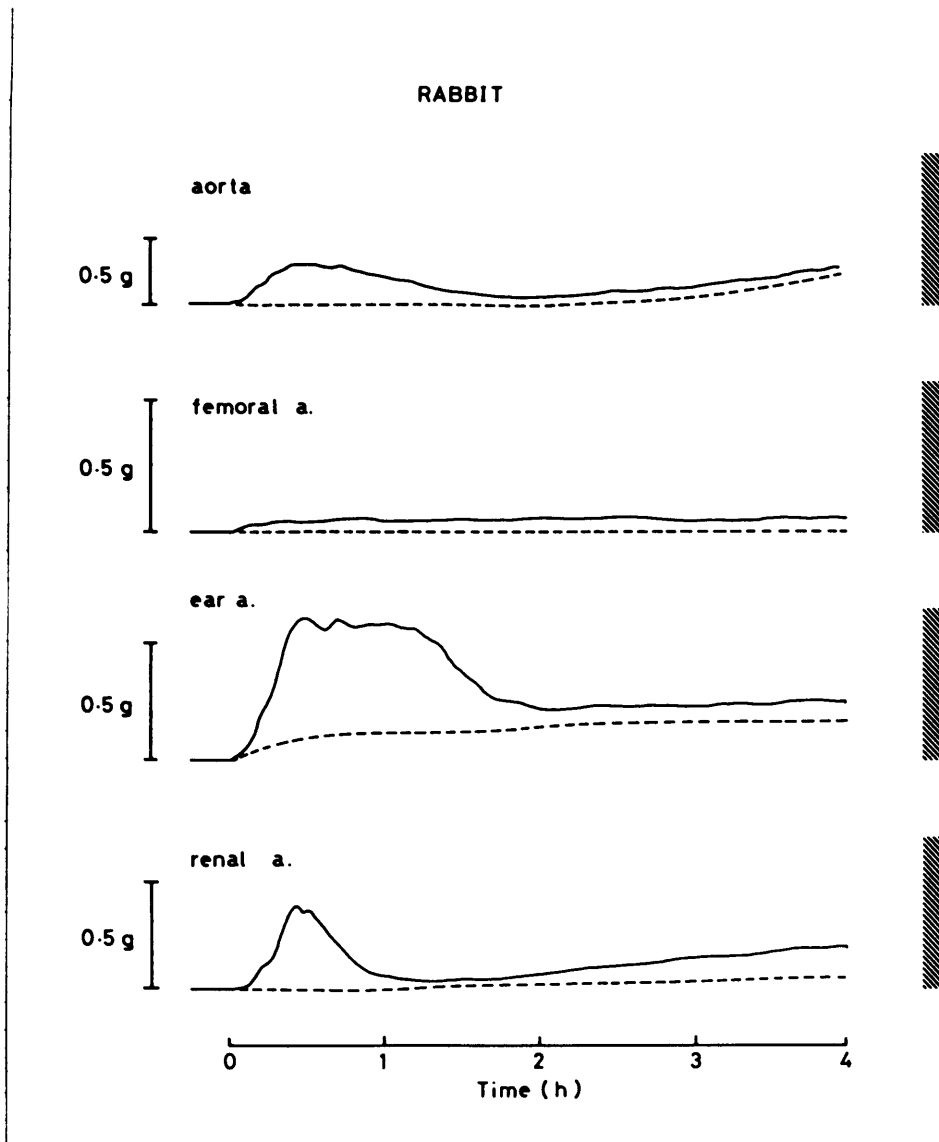


図 6 . ウサギ大動脈，大腿動脈，後耳介動脈および腎動脈におけるK除去液の収縮作用。

K 除去液は持続性の大きな収縮を発生させたが、これは、フェントラミン ($10^{-6}M$) によりほとんど影響を受けなかった。

ラット大動脈は、K 除去液適用直後に小さな収縮を発生し、続いて大きな持続性の収縮を発生させた。フェントラミン ($10^{-6}M$) は、これらの収縮に影響しなかった。大腿動脈は、K 除去液適用により一過性の収縮を発生した後、持続性の小さな収縮を発生した。前半の一過性の収縮は、フェントラミンで抑制された。ラット門脈に対する K 除去液の作用は、モルモット門脈の場合と同様であった。

フギにウサギ、モルモットおよびラットの大動脈とウサギ耳介動脈に対する K 除去液の収縮作用をフェントラミン ($10^{-6}M$) 存在下で検討した (図 7)。モルモットおよびラット大動脈の K 除去液による収縮は、2~3 時間で最大に達したのに対し、ウサギ動脈平滑筋はその立ち上がりがきわめて緩徐で、5~8 時間以上を要した。またウサギ動脈平滑筋の収

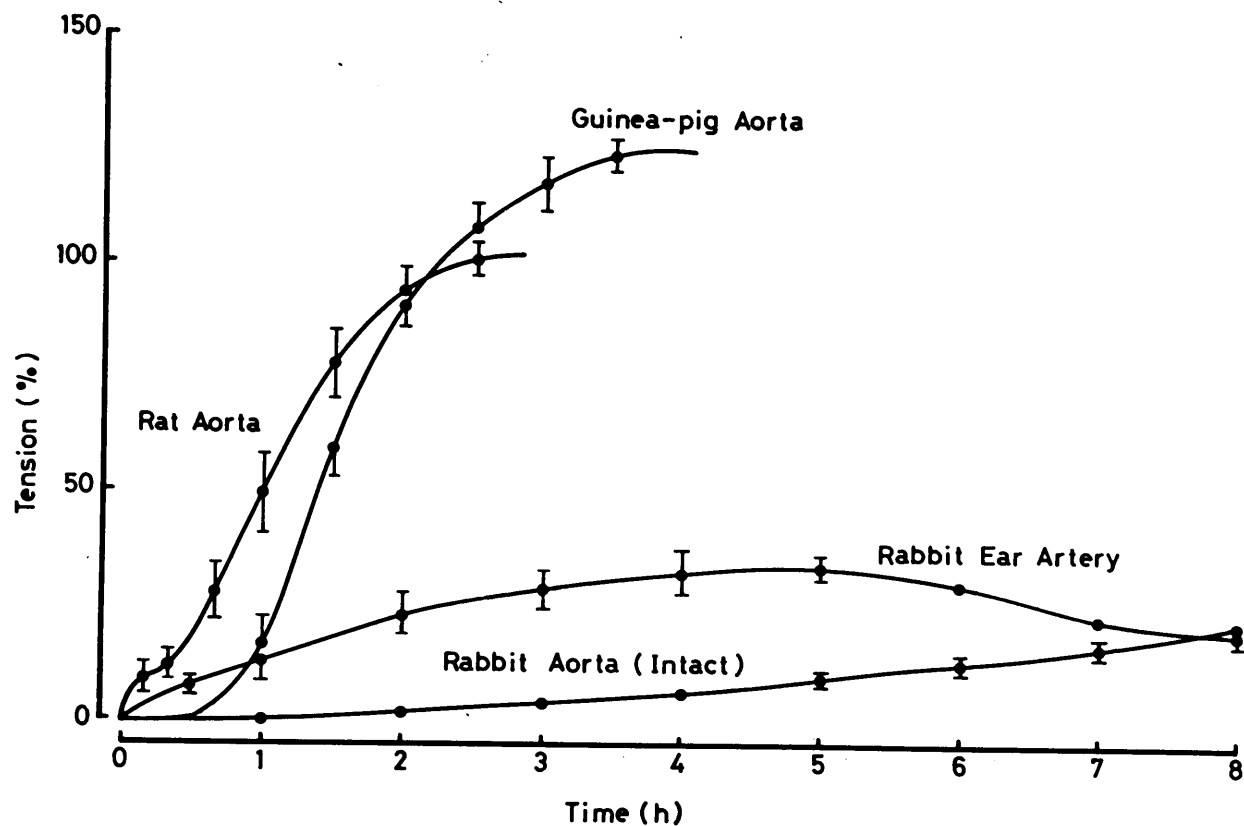


図7. フェントラミン ($10^{-6} M$) 存在下における, K 除去液のモルモット, ラットおよびウサギ大動脈とウサギ後耳介動脈に対する収縮作用。

収縮曲線は 4 ~ 8 例の平均の時間経過を示す。縦軸: 高濃度 K 液 ($65.4 mM$) 収縮に対する相対張力 (%)。横軸: 時間 (h)。n = 4 - 8。

縮の相対値は，モルモットおよびラット大動脈の場合と比べ小さかった。

3-1-3 K除去液による細胞内NaおよびK量の変化

細胞内NaおよびK量に対するK除去液の影響を「低温Li法」により検討した。図8に示すように，モルモットおよびラット大動脈のK除去液による細胞内Na量の増加あるいはK量の減少は，2～3時間で最大に達した。これに対し，ウサギ大動脈では約8時間を要した。外膜を除去したウサギ大動脈においても，同様の時間経過が示された。またウサギ耳介動脈においても，細胞内Na量の増加あるいはK量の減少が平衡状態に達するまでに75時間を要した。すなわち，これら動脈平滑筋におけるイオン含量の変化速度は，収縮の立ち上り速度とよく対応していた。

以上の成績から，K除去液による張力変化

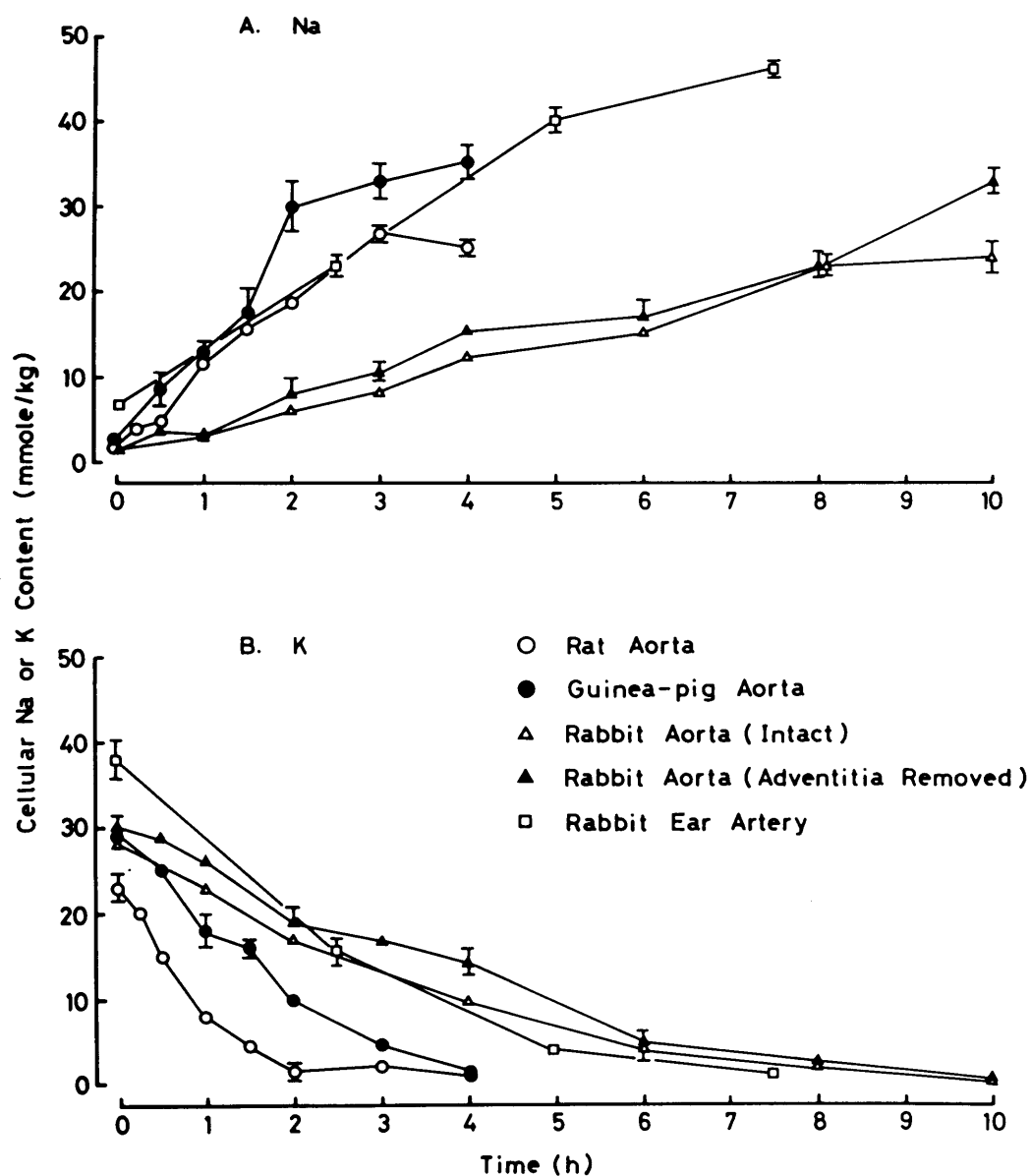


図 8. 各種血管平滑筋の K 除去液中における細胞内 Na (A) および K 量 (B) の変化。

「低温 Li 法」により測定した。縦軸：細胞内 Na および K 量 (mmol/kg)。横軸：時間 (h)。n = 5 - 10。

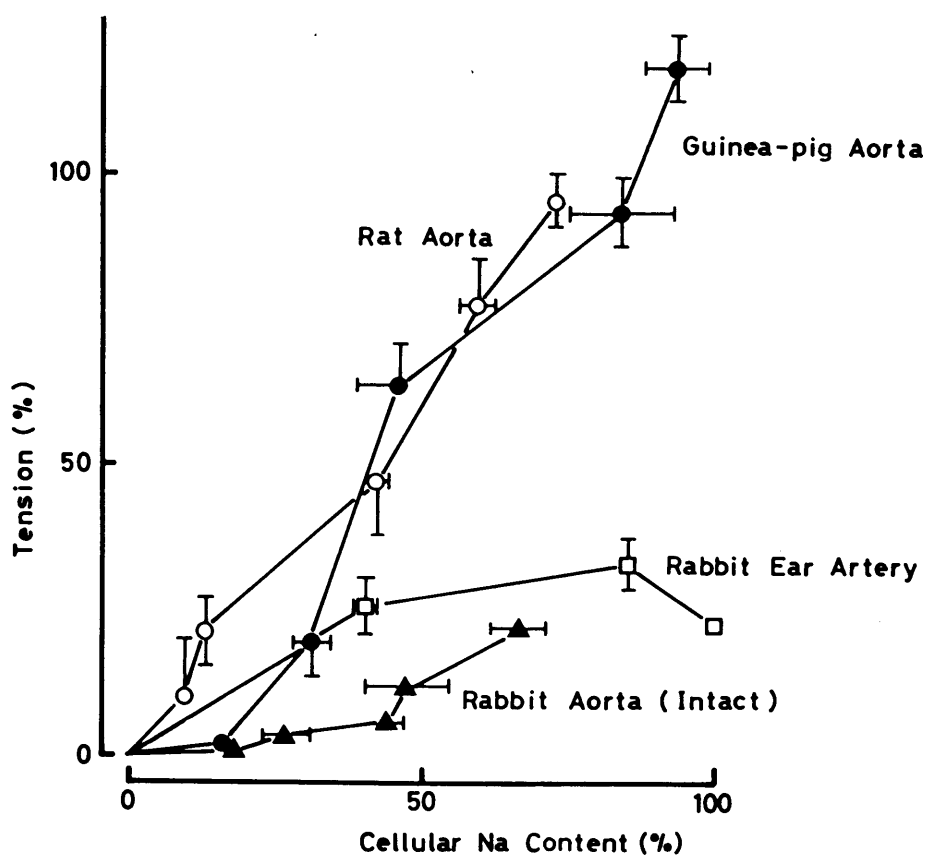


図9. K除去液中における各種血管平滑筋の張力と細胞内Na量との関係。

縦軸：張力(%)。横軸：細胞内Na量(最大値に対する%)。

と細胞内Na量との関係と比較した(図9)。モルモットおよびラット大動脈においては、張力と細胞内Na量とがよく相関したのに対し、ウサギの動脈標本においては相関が低く、十分なNa蓄積後も、観察される収縮が小さいことが明らかとなった。

3-1-4 まとめ

本節においては、ウワバインおよびK除去液を用いて各種の血管平滑筋のNaポンプを抑制し、これにより生ずる収縮を観察した。ウサギ、モルモットおよびラットから抽出した各部位の血管平滑筋は、ウワバインおよびK除去液に対してそれぞれ特徴的な収縮曲線を示した。ウサギの血管平滑筋における収縮には、フェントラミンで抑制される部分が多く、筋直接の作用と考えられる収縮の要素は少ない傾向が認められた。これに対しモルモットの動脈は、フェントラミン感受性の部分が少

なく、筋直接の収縮と考えられる部分が大きかった。ラット大動脈のK除去による収縮は、部位により異っていた。

フェントラミン存在下の各動物の動脈平滑筋のK除去液による収縮と細胞内Na蓄積の時間経過とを比較すると、ウサギ動脈標本の収縮およびNa蓄積は、モルモットおよびラットの動脈標本に比べて極めて緩徐であった。さらに、ウサギの動脈標本における収縮力と細胞内Na量との相関は、モルモットおよびラットに比べて低かった。

3-2 モルモット大動脈におけるウワバインおよびK除去液の収縮作用

前節においては、各種動物の血管平滑筋に対するウワバインおよびK除去液の収縮作用を検討したが、筋原性の収縮に関しては、モルモット大動脈が最も敏感に反応し、細胞内

Na量との対応についても高い相関関係が認められた。本節においては、このモルモット大動脈を実験材料として選び、Naポンプ抑制に伴う収縮反応について詳細に検討を加えた。

平滑筋は高濃度K液により大きな持続性の張力を発生することが広く知られている。この収縮は、細胞膜の脱分極によりCaチャンネルが活性化し、外液からCaが流入することにより発生すると考えられており、平滑筋における脱分極性の収縮モデルとして興奮収縮連関に関する多くの情報を提供してきた(Weiss, 1975; 1977)。本節においては、モルモット大動脈におけるNaポンプ抑制に伴う収縮を、高濃度K液による収縮と比較することにより、その性格を明らかにすることも試みた。

3-2-1 Naポンプ抑制との関連

摘出平滑筋を用いた実験においては、ウワバインの濃度として $10^{-5} \sim 10^{-4}$ M が一般的に

用いられている。本研究においては、これまでにウワバインの濃度として 2×10^{-5} M を用いたが、ここでモルモット大動脈の K 取り込みに対するウワバインの濃度依存性について検討を行なった。筋をいったん K 除去液で 3 時間処置し、その後 K (5.4 mM) と各種濃度のウワバインを含む正常液に移し、30 分後の組織 K 量を測定した。図 10 に示すように、モルモット大動脈の Na ポンプを介する K 取り込みは、 2×10^{-5} M のウワバインで顕著な抑制を受けることが明らかとなった。

モルモット大動脈において、ウワバイン (2×10^{-5} M) は、15 ~ 30 分の潜伏期の後、緩徐な立ち上りの収縮を発生させ、その収縮は 2 ~ 3 時間後に最大となった (図 11)。ウワバインによる収縮は、 10^{-7} M 程度から認められたが、その大きさは標本によりばらつきが大きく、明確な濃度 - 作用曲線は得られなかった。収縮が最大となった後、正常液により薬物を洗淨するとゆつくりとした弛緩が認められ、

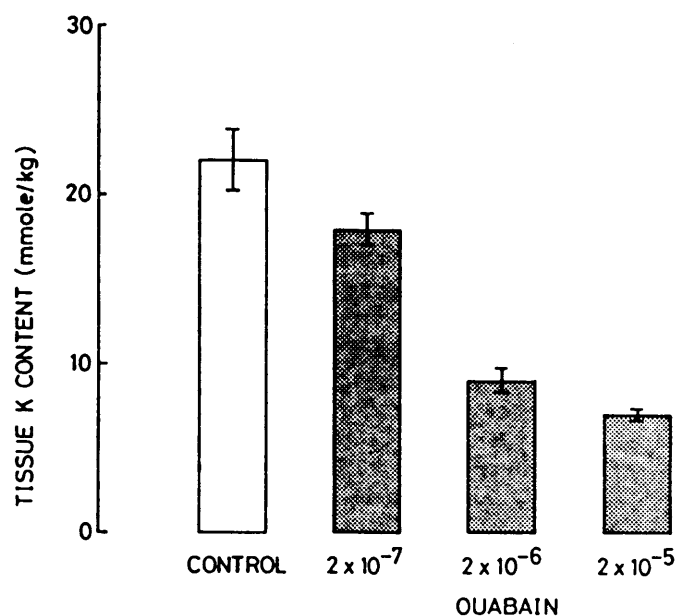


図 10 . モルモット大動脈の K 取り込みに対するウワバイン (2×10^{-7} , 2×10^{-6} および $2 \times 10^{-5} M$) の影響。

筋をいったん K 除去液で 3 時間処置し, その後正常液 ($[K]_o = 5.4 \text{ mM}$) に移し, 30 分後の組織 K 量 (mmol / kg) を測定した。 $n = 6$ 。

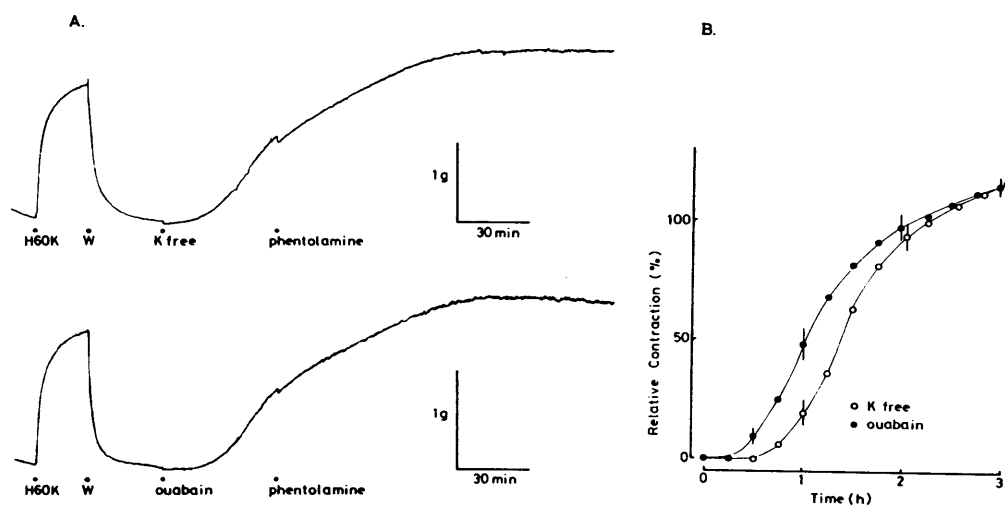


図 11 . モルモット大動脈における K 除去液およびウワバイン $2 \times 10^{-5} M$ による収縮。 $n = 6$ 。

2~3 時間後に元の張カレベルに回復した。フェントラミン ($10^{-6} M$) を収縮の途中に適用すると、一部の標本で小さな一過性の弛緩が認められた。Naチャンネルを不活性化することにより神経の興奮伝導を抑制し、組織における神経の要因を除去する作用をもつことが知られているテトロドキシン ($3.2 \times 10^{-7} M$) によっても、小さな一過性の弛緩があつた。ヒスタミンの拮抗薬であるトリペレナミン ($10^{-6} M$) は、ウワバインの収縮に対し無影響であつた。

他方、K 除去液による収縮の時間経過は、ウワバインによるそれと酷似していた (図11)。またウワバイン収縮に対する各種の拮抗薬の影響についても同様であつた。

収縮が最大となつた後に、K ($5.4 mM$) を栄養液中に再添加すると、図12に示すように、小さい、急速な弛緩の後に緩徐な弛緩が続いた。一方、ルビツウム (Rb)、アンモニウム (NH_4)、セシウム (Cs)、あるいはリチウ

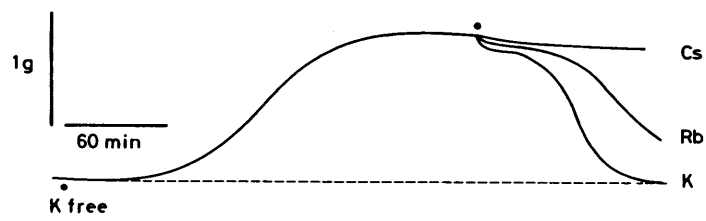


図 12. K 除去収縮に対する K, Rb および Cs (5.4 mM) の弛緩作用 (モルモット大動脈)。

ム (Li) は, Na, K-ATPase 活性に対し K の代替をすること, そしてその効力は $\text{Rb} > \text{NH}_4 > \text{Cs} > \text{Li}$ の順であることが知られている (Korenbrodt, 1977)。モルモット大動脈の K 除去液による収縮は, Rb あるいは Cs (5.4 mM) の添加によっても, K 添加と同様の弛緩が認められたが, その効力は $\text{K} > \text{Rb} > \text{Cs}$ の順であった。 K , Rb および Cs の添加による弛緩は, ウワバイン ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) の前処置により完全に抑制された。

3-2-2 外液の Ca および Na に対する依存性

モルモット大動脈のウワバインおよび K 除去液による収縮が最大となった後に, 外液の Ca (2.5 mM) を除去すると, これらの収縮は抑制された。また, Ca 除去下でウワバインあるいは K 除去液を3時間適用した場合も張力の増加は認められなかったが, その後, Ca ($0.13 \sim 2.5 \text{ mM}$) を累積的に添加すると, Ca 濃度に依

存した収縮が観察された。このCa再添加の際に $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比が一定 ($1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$) となるよう同時に外液のNa濃度を下げると、外液のCa濃度にかかわらず同じ大きさの収縮が認められた(図13)。

一方、高濃度K液による収縮も外液Ca濃度に強く依存していたが、ウワバインあるいはK除去液収縮の場合と異なり、外液のNa濃度の変化により影響されなかった(図14)。

図15は、これらの実験を定量化した成績を示している。この場合はNaの置換物質としては塩化コリンを用いたが、蔗糖あるいは塩化リチウムを用いた場合も同様の成績が得られた。

3-2-3 有機Ca拮抗薬の作用

冠状血管拡張薬として臨床的にも用いられているベラパミル, D600, ニフェジピン, ジルチアゼムなどの一群の薬物は、細胞膜のCa

A. Na = 148.7 mM

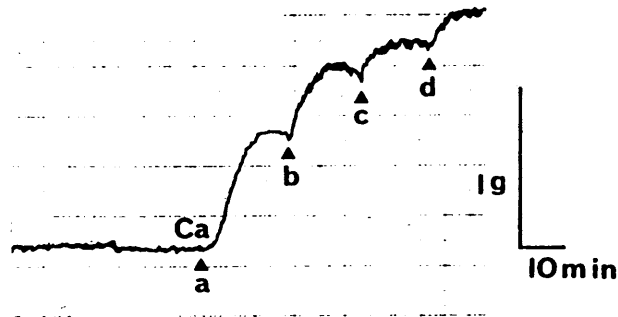
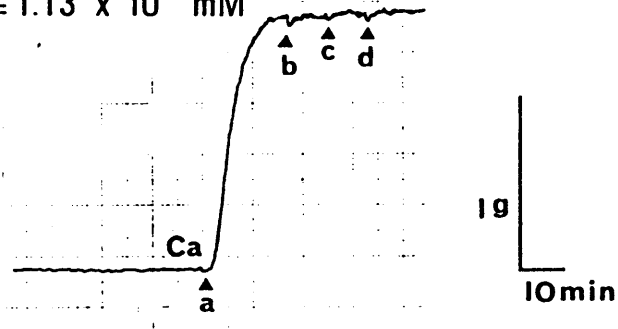
B. $\frac{Ca}{Na^2} = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$ 

図 13. K 除去収縮 (Ca 収縮) における外液 Ca および Na 濃度の影響 (モルモット大動脈)。

Ca および K 除去液で筋を 3 時間処理した後, Ca (a : 0.31 , b : 0.63 , c : 1.25 , d : 2.5 mM) を添加することにより収縮を発生させた (A : $[Na]_0 = 148.7 \text{ mM}$, B : $[Ca]_0 / [Na]_0^2 = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$, 蔗糖置換) 。

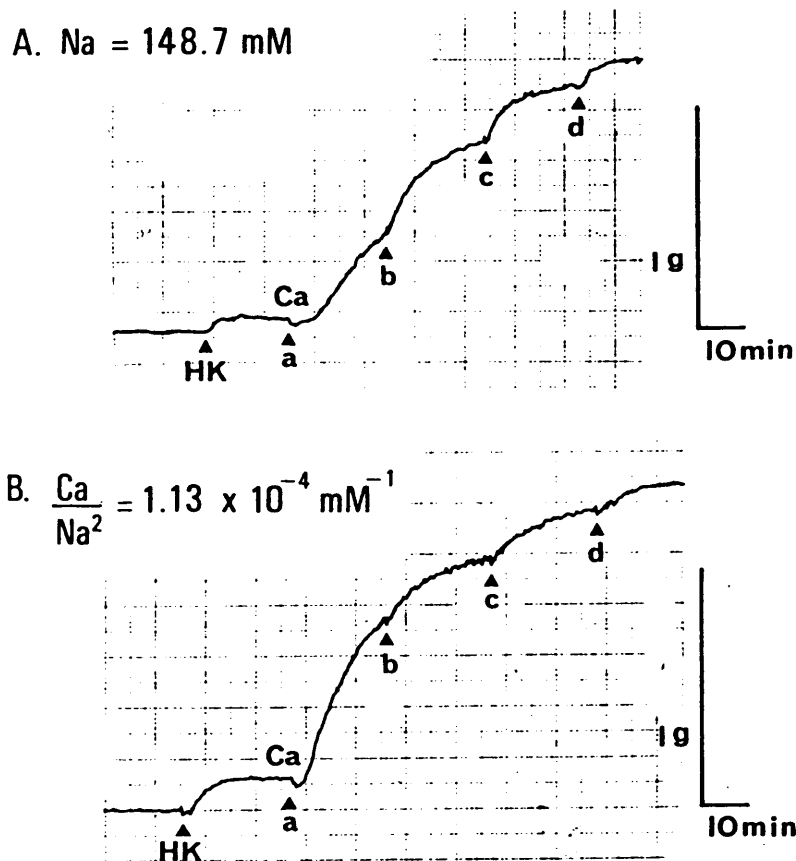


図 14 . 高濃度 K (6.54 mM) 収縮 (Ca 収縮) における外液 Ca および Na 濃度の影響 (モルモット大動脈) 。

Ca を含ませ高濃度 K 液で筋を 15 ~ 20 分前処理した後, Ca (a : 0.31 , b : 0.63 , c : 1.25 , d : 2.5 mM) を添加することにより収縮を発生させた (A : $[Na]_0 = 148.7 \text{ mM}$, B : $[Ca]_0 / [Na]_0^2 = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$, 蔗糖置換) 。

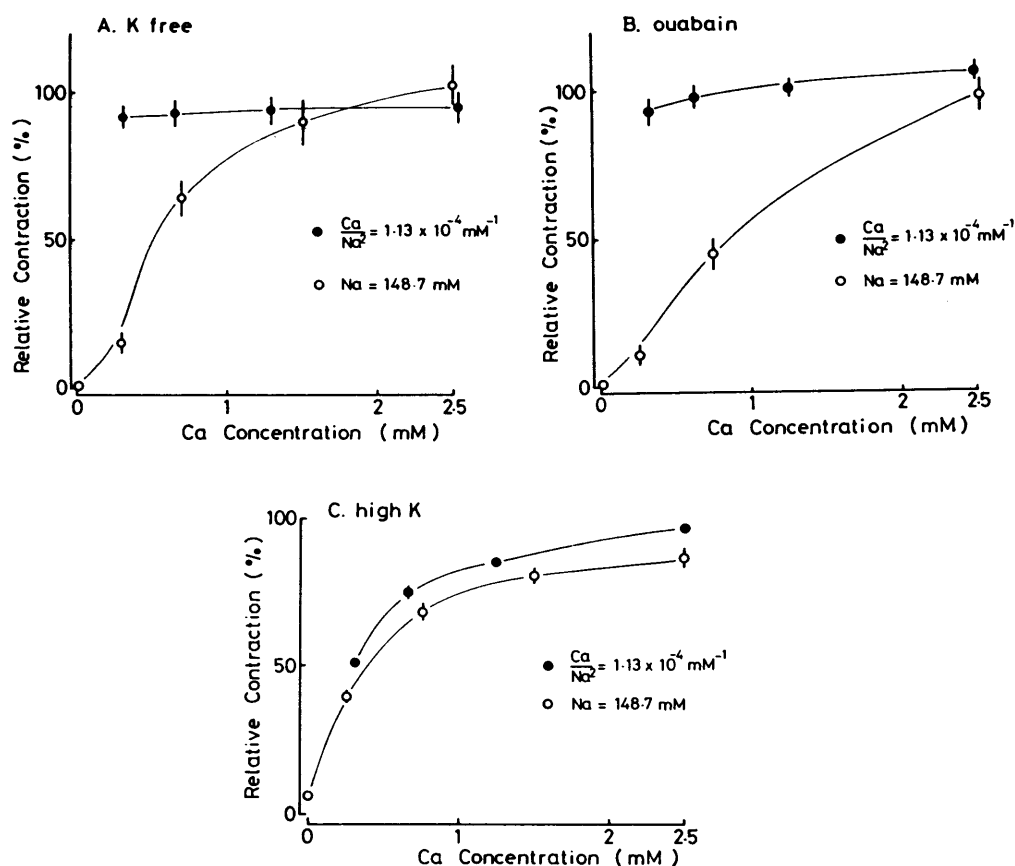


図 15. K 除去, ウワバイソ ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) およ
 が高濃度 K (65.4 mM) 収縮 (Ca 収縮) に対する
 外液 Ca および Na 濃度の影響 (モルモット大動
 脈)。

外液 Na 減少は塩化コリンで置換した。方法
 は図 14 に同じ。

縦軸：張力 (%)。横軸：Ca 濃度 (mM)。

$n = 6 - 8$ 。

チャンネルを特異的に抑制することが知られ、
 「有機Ca拮抗薬 (organic Ca antagonist)」として分類されている。平滑筋においては、高濃度K液などによる脱分極性の収縮を強く抑制することが知られている (Weiss, 1975; 1977)。
 本節においては、モルモット大動脈におけるウワバインおよびK除去液による収縮に対するベラパミルの作用を、高濃度K液による収縮に対する作用と比較した。

モルモット大動脈にウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$)
 あるいはK除去液を適用して収縮を発生させた後、ベラパミル ($10^{-6} \sim 10^{-5} M$)、ニフェジピン ($10^{-7} \sim 10^{-6} M$) およびジルチアゼム ($10^{-6} \sim 10^{-5} M$) を作用させたが、その張力にはほとんど変化は認められなかった (図16)。Caを含ませぬK除去液で筋を3時間処理した後、Ca (0.13 ~ 2.5 mM) を累積的に投与して得られるCa収縮に対し、ベラパミル ($10^{-6} M$) の前処置は、低濃度Ca域において多少の抑制作用を示したが、Ca (2.5 mM) による収縮には無影響であった (

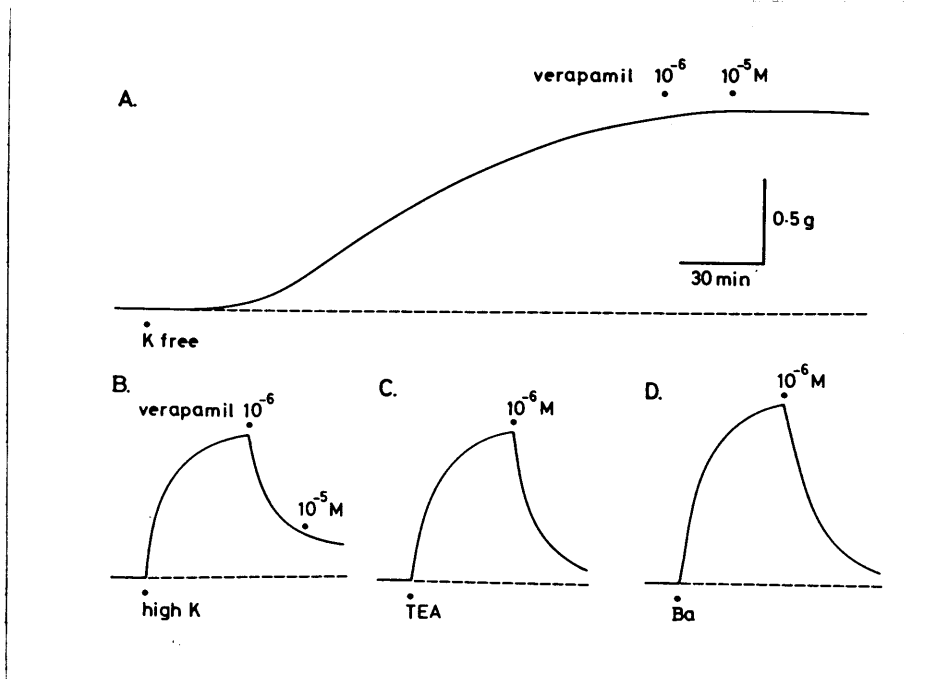


図 16. K 除去, K (65.4 mM), TEA (40 mM) および Ba (15 mM) 収縮に対するベロパミル (10⁻⁶ ~ 10⁻⁵ M) の作用 (モルモット大動脈)。

図17)。Ca添加時に $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比を一定に保つと外液のCa濃度にかかわらず同じ大きさの収縮が発生することはすでに述べたが、これらの収縮に対しても、ベラパミル ($10^{-6}M$) は抑制作用は示さなかった(図17)。

一方、ベラパミル ($10^{-6}M$) は、モルモット大動脈において高濃度K液による収縮を、他の動脈平滑筋におけると同様に顕著に抑制した(図18)。高濃度K液とは異なる機序、すなわちK透過性を抑制することにより細胞膜を脱分極させることが知られているテトラエチルアンモニウム (TEA) およびバリウム (Ba) (KroegerとStephens, 1975; Hermsmeyer, 1976a) は、モルモット大動脈を収縮させた(図16)。ベラパミル ($10^{-6}M$) は、これらの収縮に対しても強い抑制作用を示した。他方、ベラパミルはノルエピネフリン ($10^{-5}M$) による収縮に対し抑制作用を示さなかった。

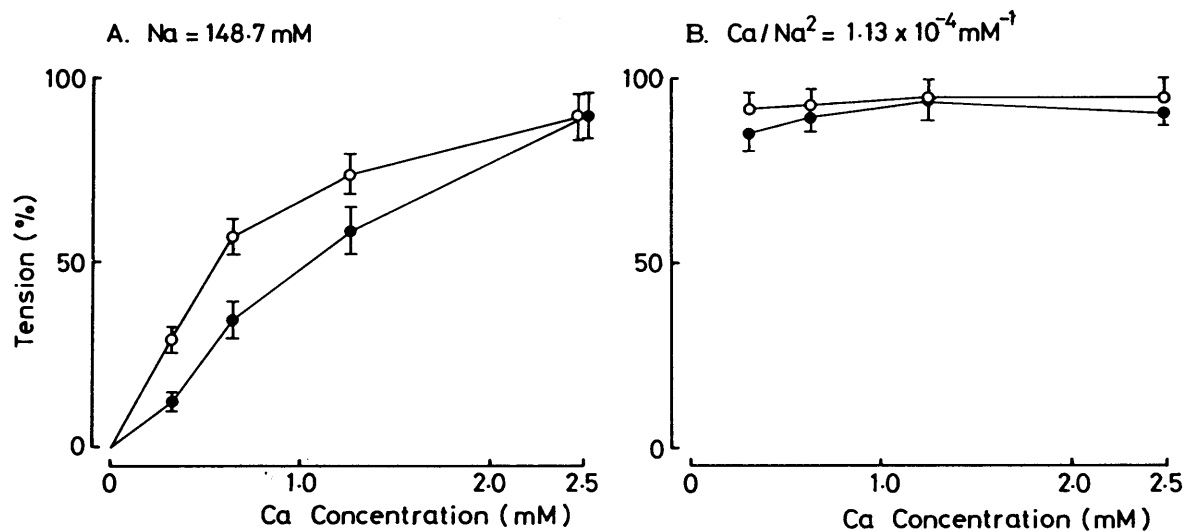


図 17 . K 除去収縮 (Ca 収縮) に対するベラパミル ($10^{-6} M$) の影響 (モルモット大動脈)。

A : Ca 添加時の $[Na]_0 = 148.7 \text{ mM}$, B : $[Ca]_0 / [Na]_0^2 = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$ (塩化コリン置換) 。 ○ ; 対照 , ● ; ベラパミル存在下。縦軸 : 張力 (%) 。 横軸 : Ca 濃度 (mM) 。 $n = 4 - 8$ 。

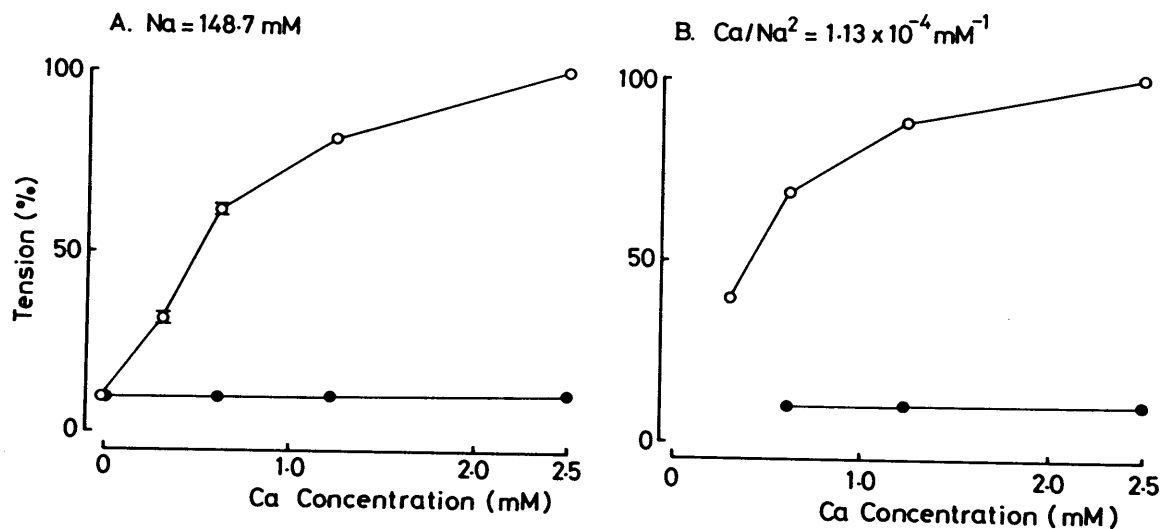


図 18. K (65.4 mM) 収縮 (Ca 収縮) に対するベラパミル ($10^{-6}M$) の影響 (モルモット大動脈)。

A : $[Na]_0 = 148.7 \text{ mM}$, B : $[Ca]_0 / [Na]_0^2 = 1.13 \times 10^{-4} \text{ mM}^{-1}$ (塩化コリン置換)。○ ; 対照 , ● ; ベラパミル存在下。縦軸 : 張力 (%) , 横軸 : Ca 濃度 (mM) 。 $n = 4 - 8$ 。

3-2-4 高濃度 Mg の影響

Ca が作用する多くの生体機構に対し、過剰のマグネシウム (Mg) が非特異的に抑制作用を示すことは、よく知られている (Mordas と Wacker, 1978)。平滑筋においても、高濃度の Mg が収縮反応を抑制することが報告されている (Altura と Altura, 1974, 1981) ので、モルモット大動脈の K 除去液および高濃度 K 液による収縮に対する高濃度 Mg に対する影響を検討した。

K 除去液による収縮が一定となった後に、Mg (8, 16 および 32 mM) を累積的に投与したが、Mg (8 および 16 mM) の投与によつては張力に変化はなく、Mg (32 mM) の添加ではかえつて張力の増加が認められた (図 19)。高濃度 K 液による収縮は、過剰の Mg (8, 16 および 32 mM) により濃度依存性に抑制された (図 19)。さらに、K 除去液下の Ca 収縮に対して、

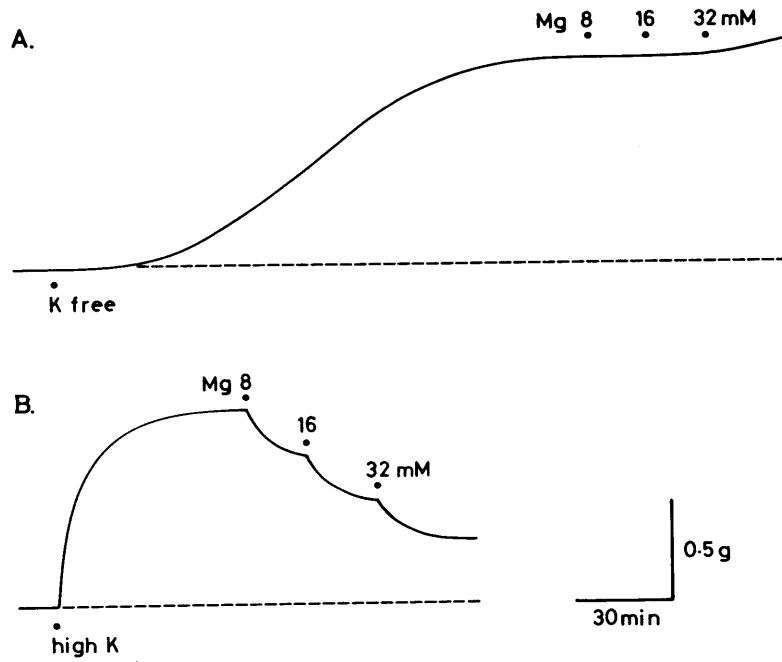


図 19. K 除去および高濃度 K (65.4 mM) 収縮に対する高濃度 Mg の影響 (モルモット大動脈)。

Mg (16 mM) の前処置は影響しなかったが、高濃度 K 液下の Ca 収縮は、Mg (16 mM) の前処置により強く抑制された (図 20)。

3-2-5 Sr の代替性

アルカリ土類の中で、化学的性質が Ca と最も良く似ている元素はストロンチウム (Sr) である。したがって生物反応においても、Ca の作用が Sr で代替されることが期待される。骨格筋や心筋において Ca の代用として Sr が収縮を惹起することはよく知られており (Ebashi ら, 1969; 江橋, 1976), また平滑筋においても同様の現象が認められている (Daniel ら, 1962; Urakawa ら, 1968; Hudgins, 1969)。そこで K 除去液収縮における Sr の代替性について検討した。

Ca を含まぬ K 除去液で 3 時間処理した後、Sr (1 ~ 31.1 mM) を累積的に添加すると、Sr 濃度に依存した収縮が観察された。この Sr 収縮

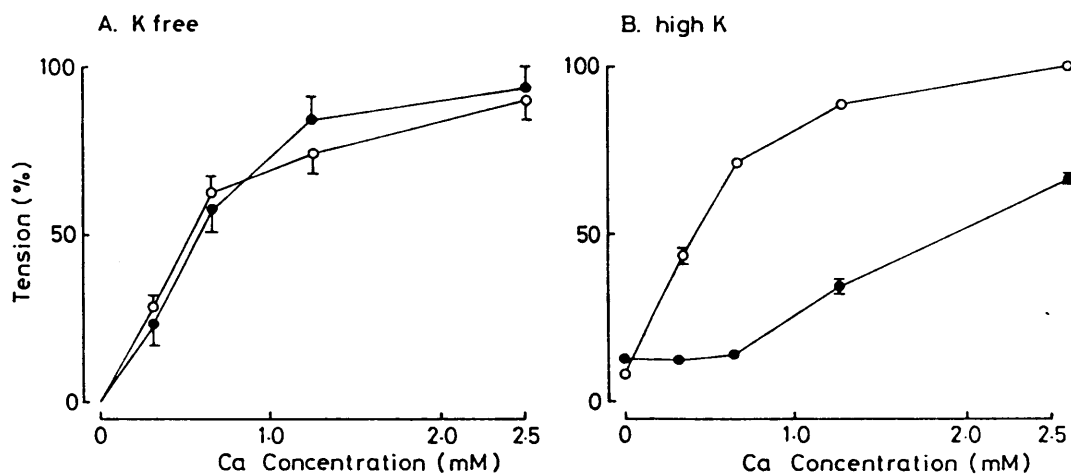


図 20. K 除去 (A) および高濃度 K (65.4 mM) (B) 収縮 (Ca 収縮) に対する高濃度 Mg (16 mM) の影響 (モルモット大動脈)。

○ ; Mg 1 mM , ● ; Mg 16 mM 。 縦軸 : 張力 (%) 。
横軸 : Ca 濃度 (mM) 。 $n = 4 - 8$ 。

は Sr を除去することにより弛緩し，再び Sr を適用することにより 1 回目と同じ大きさの収縮が発生した。したがってこの収縮は，細胞内に残存した Ca を利用して惹起されたものではなく Sr の筋タンパクに対する直接作用により起るものと考えられる。一方，K 除去液の収縮における濃度 - 作用曲線から，Sr と Ca との効力比は約 1 : 5 と計算された (図 21)。ベラパミル ($10^{-6} M$) は，Ca 収縮の場合と同様，低 Sr 濃度域において若干の抑制作用を示した。K 除去液の場合と同様，高濃度 K 液中における Ca 収縮も，Sr により代替された (図 21)。Sr と Ca との効力比は，約 1 : 3 であつた。K 除去液収縮の場合と異なりベラパミル ($10^{-6} M$) はこの Sr 収縮を強く抑制し，濃度 - 反応曲線を右に平行移動した。

3-2-6 ^{45}Ca 動態

K 除去液および高濃度 K 液中における ^{45}Ca

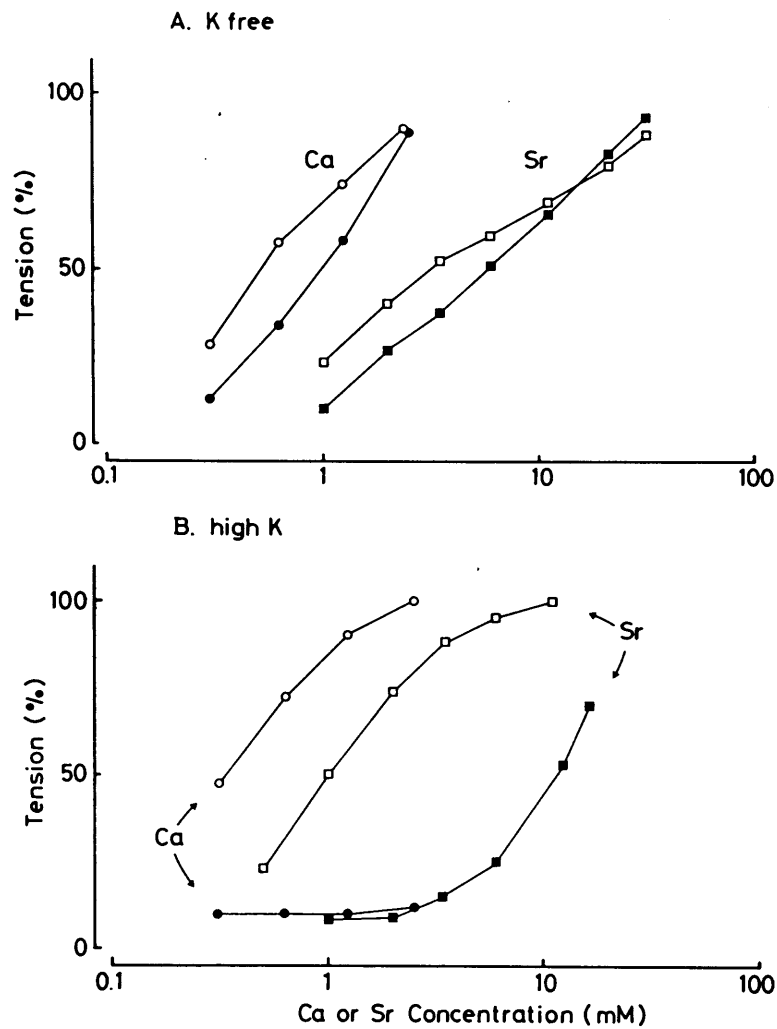


図 21. K 除去および高濃度 K 収縮における Sr の代替性 (モルモット大動脈)。

筋を, Ca を含まぬ K 除去液で 3 時間あるいは高濃度 K 液 (65.4 mM) で 10 分間処理した後, Ca (○) あるいは Sr (□) を添加して収縮を発生させた。黒ぬきはベラパミル (10^{-6} M) 存在下。縦軸: 張力 (%)。横軸: Ca あるいは Sr 濃度 (mM)。n = 4 - 8。

動態を「低温La法」により測定した。まず正常液中における ^{45}Ca 取り込み、すなわち外液の ^{45}Ca と細胞内の ^{40}Ca の交換について検討した。細胞内 ^{45}Ca 量は ^{45}Ca 添加後20分で約300 $\mu\text{M}/\text{kg}$ 湿重量となり、以後変らなかつた。K除去液で3時間処理した筋に ^{45}Ca を取り込ませると、6分後から有意な取り込みの増加が認められた(図22)。高濃度K液下においても、同様な ^{45}Ca 取り込みの増加が認められた。つぎにK除去液下および高濃度K液下の ^{45}Ca 取り込み(6分値)に対するベラパミル(10^{-6} M)およびMg(16 mM)の影響を検討した。K除去液中における ^{45}Ca 取り込みの増加は、ベラパミルおよび過剰のMgにより影響を受けなかつた(図23)。一方、高濃度K液中での ^{45}Ca 取り込みは、ベラパミルおよびMgにより有意に抑制された。

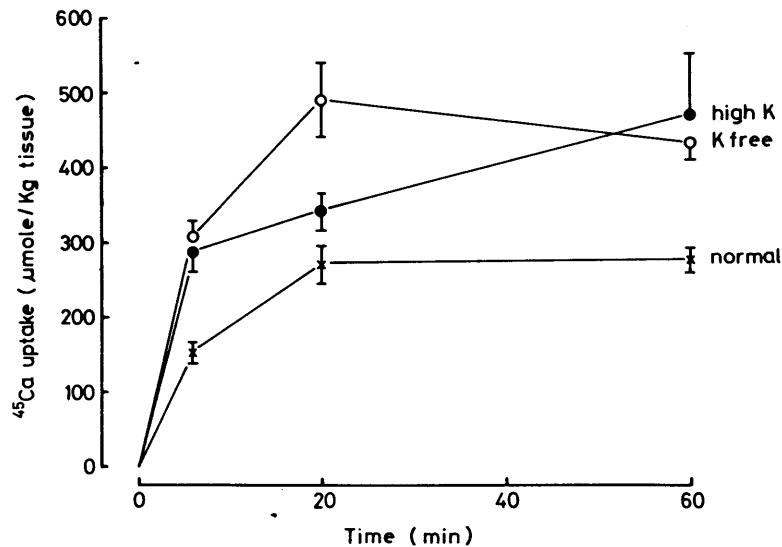


図 22. K 除去, 高濃度 K (65.4 mM) および正常液中における ^{45}Ca 取り込み (モルモット大動脈) の時間経過。

筋は K 除去液で 3 時間, あるいは高濃度 K 液で 10 分間前処置し, ^{45}Ca を含む各々の栄養液中で ^{45}Ca を取り込ませた。次に低温 (1°C) La 液で 1 時間処理し, 細胞外の ^{45}Ca を除いた。縦軸: ^{45}Ca 取り込み量 ($\mu\text{mol} / \text{kg}$)。横軸: 時間 (h)。n = 6 - 14。

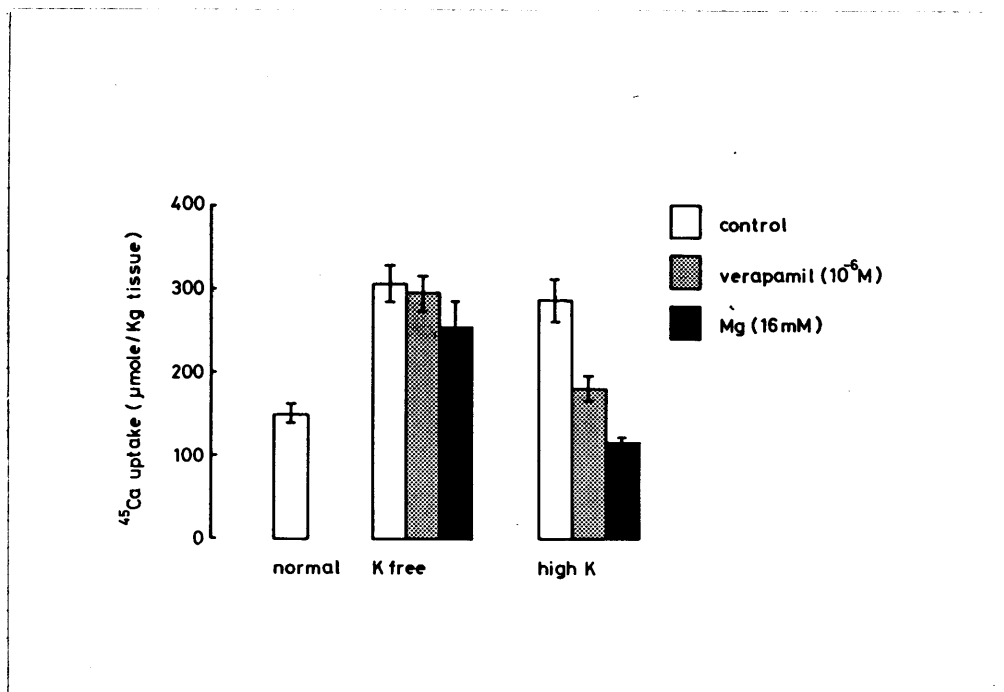


図 23. K 除去液および高濃度 K 液下の ^{45}Ca 取り込み (6 分間) に対するベラパミル (10^{-6} M) および Mg (16 mM) の影響 (モルモット大動脈)。n = 6 - 14。

3-2-7 ま と め

本節においては、モルモット大動脈を実験材料として選び、ウワバインおよびK除去液を用いてNaポンプを抑制し、細胞内にNaを蓄積させ、このとき観察される収縮の性格について検討した。

ウワバインおよびK除去液による収縮は、外液のCa濃度に強く依存したが、同時に外液のNa濃度にも影響を受け、その張力の大きさは $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比に従っていた。このような現象は高濃度K液による収縮には見られなかった。また脱分極性の収縮を強く抑制する有機Ca拮抗薬、あるいは過剰のMgに対しても強い抵抗性を示した。さらにSrの代替性に関する実験からは、SrとCaの効力比がK除去液による収縮と高濃度K液による収縮の場合で差異が認められた。

さらに、K除去液下および高濃度K液下で⁴⁵Ca取り込みの増加が認められた。この増加

は、有機Ca拮抗薬および過剰のMgにより影響されず、張力変化に対する効果とよく対応していた。

以上の成績から、モルモット大動脈におけるNaポンプ抑制による収縮の性格は、高濃度K液による収縮のそれとは明らかに異なることが示唆された。Naイオン動態との関係から考えて、モルモット大動脈平滑筋にはNa-Ca交換機構が存在し、この機構を介してウワバインあるいはK除去液による収縮が惹起されることが考えられる。

3-3 血管平滑筋に対するNa除去液の作用

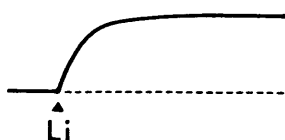
血管平滑筋収縮におけるNaの役割をさらに明らかにするため、細胞内Na量を変えずに細胞膜内外のNa濃度勾配を減少させるNa除去液の作用について検討した。Na除去液を作製する場合、栄養液の浸透圧を一定に保つために

NaCl を他の物質で置換しなくてはならない。
本実験では、NaCl の置換物質として一般によく用いられる蔗糖、塩化コリンおよび LiCl を使用して比較した。

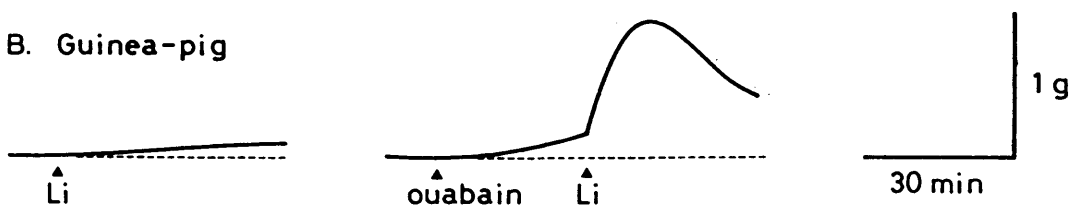
3-3-1 各種動物の大動脈標本に対する Na 除去液の収縮作用

まず、ウサギ、モルモットおよびラットの
大動脈に対する Li 置換液の影響をフェントラ
ミン ($10^{-6}M$) 存在下で比較した。Li 置換液は
ウサギおよびモルモット大動脈の静止張力に
対しほとんどの影響を与えなかったのに対し、
ラット大動脈においては持続性の収縮を発生
させた (図 24)。しかし、ウサギおよびモル
モット大動脈は、ウワバイン ($2 \times 10^{-5}M$) ある
いは K 除去液で適当時間処理し、細胞内に Na
を蓄積させた後 Li 置換液を作用させると、収
縮を発生した。図 25 は、ウワバイン ($2 \times 10^{-5}M$)
前処置時間 (h) と Li 置換液による収縮 (%)

A. Rat



B. Guinea-pig



C. Rabbit

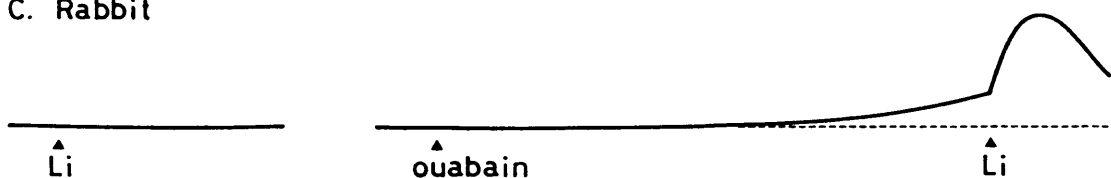


図 24. ラット (A), モルモット (B) およびウサギ (C) 大動脈にかける Na 除去液 (Li 置換) の収縮作用。

モルモットおよびウサギ大動脈においては、ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) でそれぞれ 30 分および 120 分間 Na 負荷を行った後、外液より Na を除去すると、立ち上りの速い収縮が発生した。

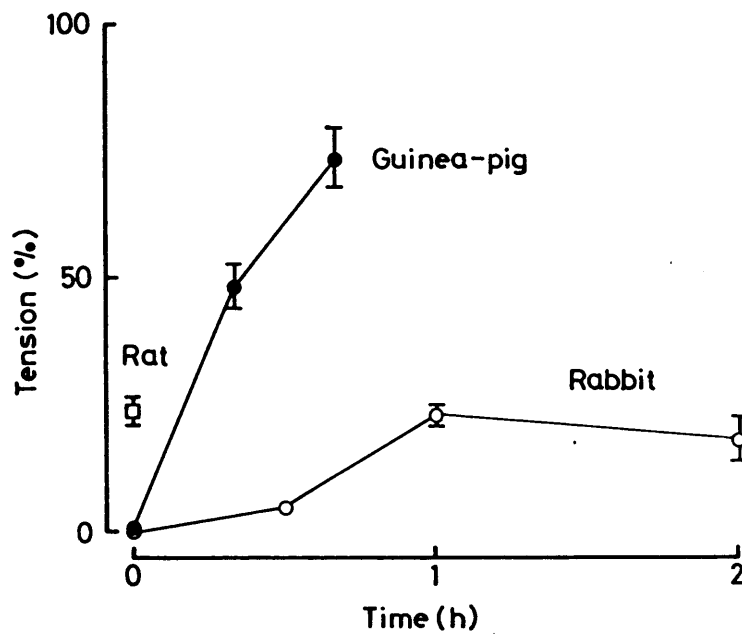


図 25. モルモット, ラットおよびウサギ大動脈における Na 除去液 (Li 置換) による収縮の大きさとウワバインによる Na 負荷時間の関係。

モルモットおよびウサギ大動脈は, ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) で適当時間処置した後, Li 液で収縮を発生させた。縦軸: 張力 (%)。横軸: 時間 (h)。n = 4。

との関係を示している。モルモット大動脈においては、ウワバイン前処置により、Li置換液による収縮は増大したが、ウサギ大動脈においてはウワバインの前処置によってもさほどの増大は認められなかった。

以上のよろに、Na除去液の収縮作用にも動物種差が認められ、K除去液に対する収縮反応と同様に、ウサギ大動脈の反応性は、モルモットおよびラットに比べ低いことが明らかとなった。そこで以下の実験においては、ウワバインあるいはK除去液の作用を検討した時と同様、モルモット大動脈に対するNa除去の作用をさらに詳細に検討した。

3-3-2 モルモット大動脈に対する Na除去液の収縮作用

図26(左)は、フェントラミン($10^{-6}M$)存在下での各種のNa除去液の収縮作用を示している。蔗糖置換液は一過性収縮の後、持続性

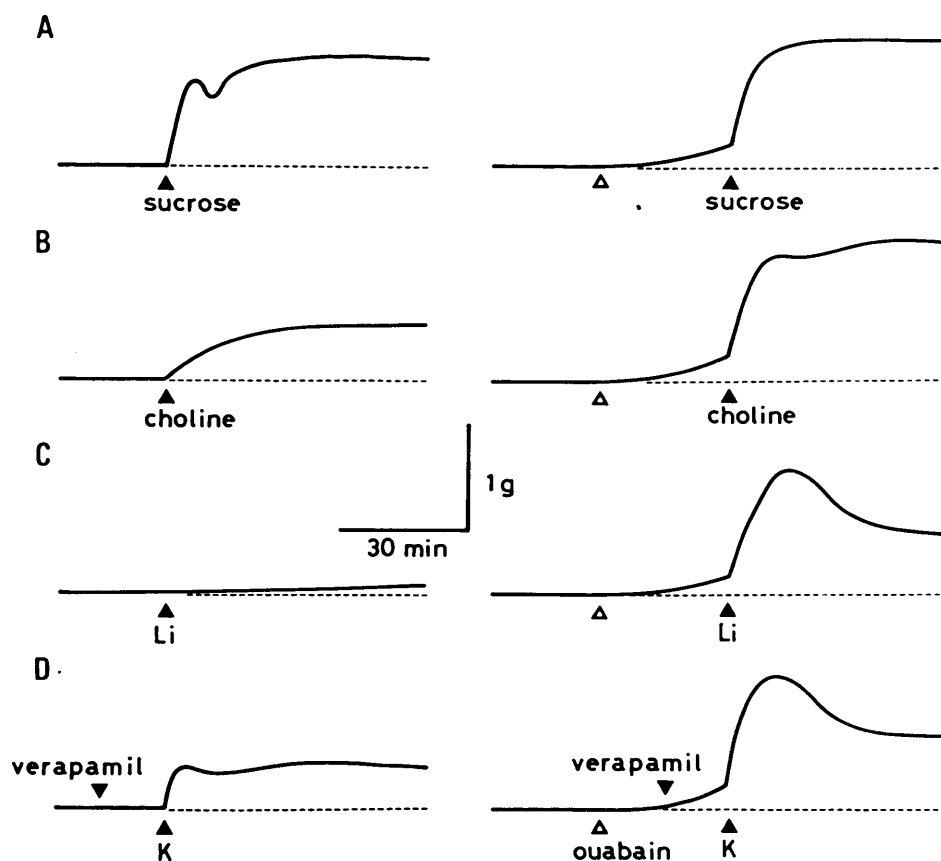


図 26. モルモット大動脈における，各種の Na 除去液の収縮作用。

Na の置換物質として，蔗糖（A），塩化コリン（B），Li（C）および K（D）の 4 種を用いた。正常筋における上記の Na 除去液の作用を観察した後，Na 負荷筋（ウワバイン $2 \times 10^{-5} M$ で 30 分前処置）に対する作用を検討した。

収縮を発生させた。塩化コリン置換液は緩徐な立ち上りの持続性収縮を発生させた。Li置換液はわずかに静止張力を増加させた。次に、これらの収縮に対するベラパミルおよびCa除去液の作用を検討した。蔗糖置換液による収縮が最大となった後ベラパミル ($10^{-6}M$) またはCa除去液を適用したが、張力に影響はなかった。一方、塩化コリン置換液による収縮はベラパミル ($10^{-6}M$) で半分程度抑制され、またCa除去液下では収縮の発生はみられなかった。Li置換液による収縮はそれ自体小さく、ベラパミルあるいはCa除去液の影響は明らかではなかった。

図26(右)は、ウワバイン ($2 \times 10^{-5}M$) で30分間前処理した筋に対する各種Na除去液の作用を示している。Na除去液による収縮は、いずれの置換物質を用いた場合でも、ウワバインの前処置により増強された。蔗糖あるいは塩化コリン置換液では、持続性の収縮が観察され、Li置換液の場合は一過性であった。

Na除去の際にK置換を行なうことは、Kによる脱分極作用のために、あまり一般的ではないが、脱分極作用による収縮をベラパミル適用により抑制した状態で、K置換液の作用を検討した(図26D)。K置換液による正常筋の収縮は、ベラパミル($10^{-6}M$)の前処置により強く抑制された。ウワバインの前処置でNa負荷を行なうと、ベラパミル存在下でのK置換液による収縮は増強された。また収縮の時間経過はLi置換のそれとよく似ていた。一方、ウワバインの前処置時間を30分に固定し、その後各種Na濃度液(Li置換)を作用させると、収縮の大きさは外液Na濃度に依存していた(図27)。

次に、ベラパミル、Ca除去および高濃度MgのNa除去液収縮に対する影響を、ウワバイン($2 \times 10^{-5}M$)で前処置したNa負荷筋を用いて検討した。図28は、Li置換液による収縮に対するCa除去(EGTA $0.1mM$ 添加)とベラパミル($10^{-6}M$)の影響を示している。ベラパミルは、Li

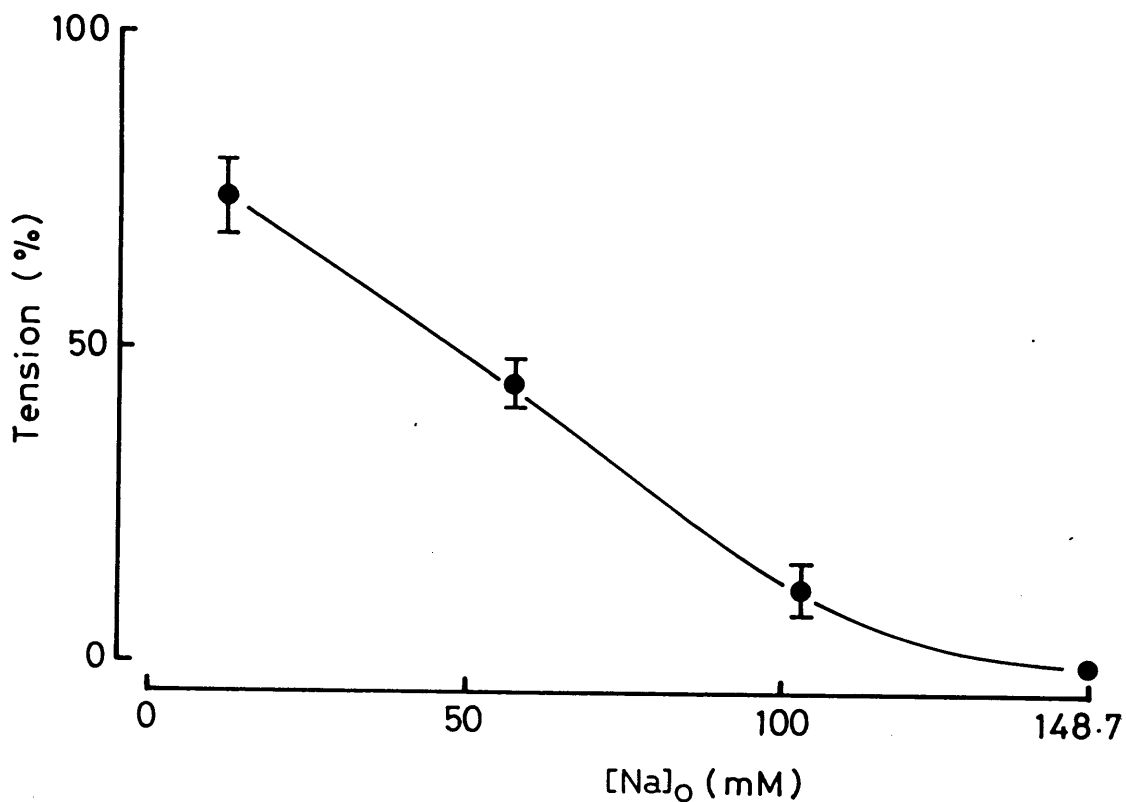


図 27. 外液 Na 濃度と張力との関係 (モルモット大動脈)。

あらかじめ Na 負荷 (ウワバイン $2 \times 10^{-5} M$ で 30 分間処理) した筋において, 各種 Na 濃度液 (Li 置換) により収縮を発生させた。縦軸: 張力 (%)。横軸: 外液 Na 濃度 (mM)。n = 5 - 8。

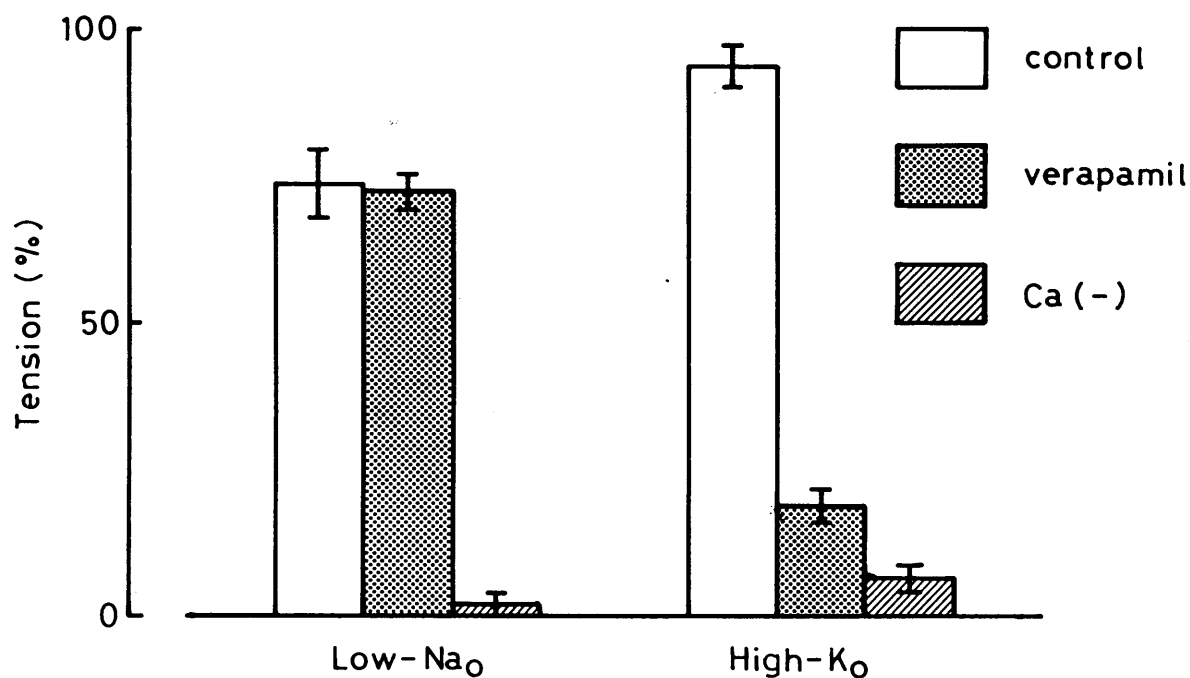


図 28. Na 除去 (Li 置換) および K 収縮に対する
 ヴェラパミル ($10^{-6} M$) および Ca 除去 (EGTA $0.1 mM$)
 の影響 (モルモット大動脈)。 $n = 4 - 6$ 。

	LOW-Na		HIGH-K (65.4 mM)
	CHOLINE	SUCROSE	
CONTROL	68.5 ± 10.0 (6)	43.5 ± 9.8 (6)	100.0
VERAPAMIL (10 ⁻⁶ M)	67.2 ± 3.7 (4)	36.3 ± 7.0 (6)	27.6 ± 2.5 (5)**
HIGH-Mg (16 mM)	50.1 ± 12.1 (6)	47.8 ± 9.2 (4)	28.2 ± 3.6 (5)**

TENSION (%), ** p < 0.001

表 1. Na 除去液 (塩化コリンあるいは蔗糖置換) および高濃度 K 液 (65.4 mM) による収縮に対するベラパミル (10⁻⁶M) あるいは高濃度 Mg (16 mM) の影響 (モルモット大動脈)。

置換液による収縮に影響を与えなかつたが、高濃度K液(45.4 mM)による収縮を顕著に抑制した。Ca除去は、Li置換液および高濃度K液による収縮をほぼ完全に抑制した。一方、蔗糖および塩化コリン置換液による収縮も、ベラパミル(10^{-6} M)により影響されず、またMg(16 mM)も抑制作用を示さなかつた(表1)。

3-3-3 張力と細胞内Na量との関係

以上の成績から、モルモット大動脈のNa除去液による収縮は、Na除去液を作用させる直前の細胞内Na量に依存することが考えられた。以下、収縮張力と細胞内Na量との関係を定量化することを試みた。細胞内Na量は二つの異なる方法により変化させた。

第一の方法として、Caを含まず種々の濃度のNaと(Li置換)、ウワバイン(2×10^{-5} M)を含むNa負荷液を用意し、筋をこのNa負荷液で3時間処理することにより、細胞内Na量を変化

させた。図29は、Na負荷液中のNa濃度とLi法により測定された細胞内Na量との関係を示しているが、両者の間には直線関係が認められた（相関係数 = 0.99, $P < 0.01$ ）。細胞内外のNa濃度勾配は、ウワバイン感受性のNaポンプのみによって保持されていると一般に考えられているので、この処置を行なった筋の細胞内Na濃度とNa負荷液中のNa濃度とは一致していると考えられる。以上の処理を行なった後、外液をCa (2.5 mM) を含むNa除去液 (Li置換) と交換して収縮を発生させた。図30は、収縮の大きさと細胞内Na量との関係を示しているが、Na除去液による収縮は細胞内Na量に依存することが明らかとなった。

第三の方法としては、筋をいつたんウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) を含むCa除去液で3時間処理して細胞内にNaを十分に蓄積させ、続いてCaおよびNaを含まぬNa洗淨液 (Li置換) に移し、適当な時間処理をすることにより部分的に細胞内Naを流出させ、各種の細胞内Na量を持つ

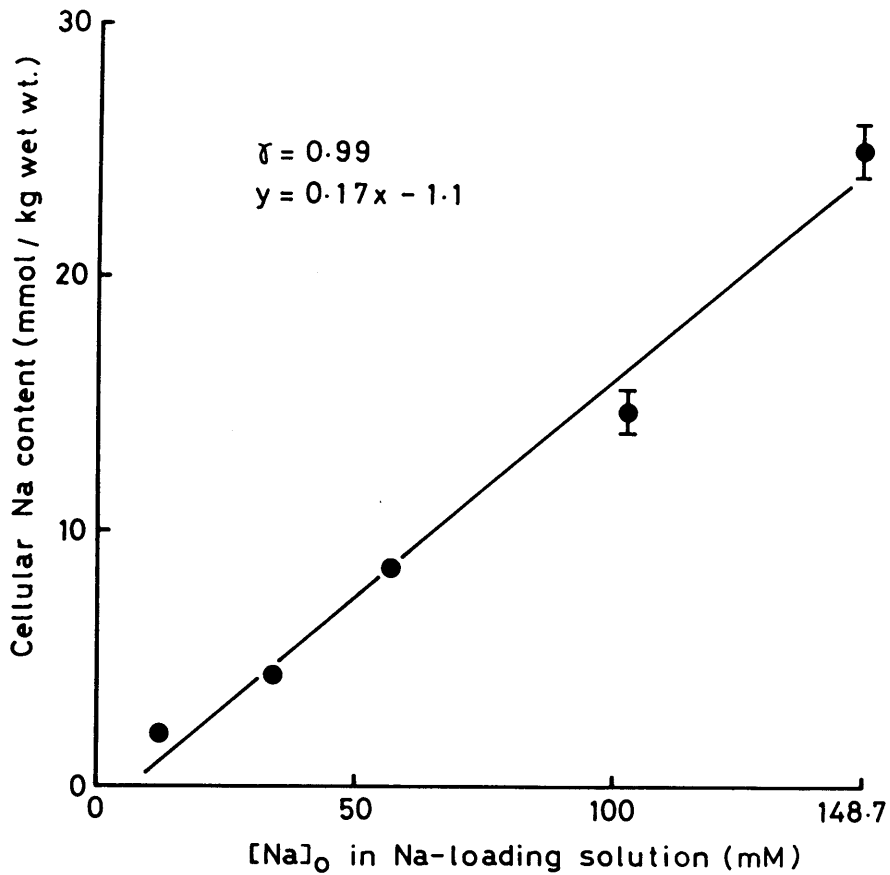


図 29. 細胞内 Na 量と Na 負荷液の $[Na]_0$ との関係 (モルモット大動脈)。

筋を Na 負荷液 (ウワバイソ $2 \times 10^{-5} M$ を含み Ca 除去した種々の Na 濃度液) で 3 時間処理した後, 「Li 法」により細胞内 Na 量を求めた。Na 負荷液の $[Na]_0$ と細胞内 Na 量との間に有意な相関関係 ($p < 0.01$) が認められ, 種々の $[Na]_0$ を持つ Na 負荷液を用いることにより, 細胞内 Na 量を種々に変化させることが示された。

縦軸: 細胞内 Na 量 ($mmol/kg$)。横軸: Na 負荷液中の Na 濃度。 $n = 6$ 。

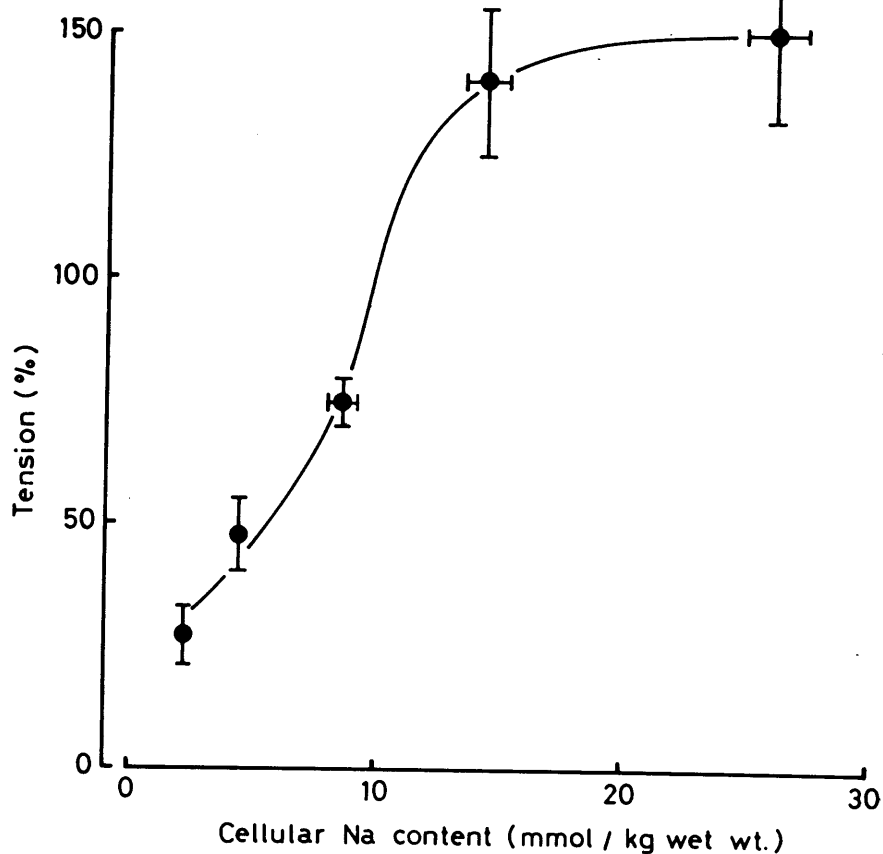


図 30 . 細胞内 Na 量と張力との関係 (モルモット大動脈)。

図 29 で示した方法により種々の細胞内 Na 量を示す筋標本を作製した。その後 Ca (2.5 mM) を含む Na 除去液 (Li 置換) により張力を発生させた。縦軸 : 張力 (%)。横軸 : 細胞内 Na 量 (mmol/kg)。

筋を作製した。Caを含まぬNa洗淨液で細胞内Naを流出させる過程で，Ca（ 2.5mM ）を添加して収縮を発生させたが，Na洗淨液による処置時間が短いほど，すなわち細胞内Naがより多く残存しているほど収縮は大きかった（図32）。以上の実験に加え，Na洗淨液中にウワバインを存在させた場合の細胞内Na量の減少と，Caの再添加による収縮との関係についても検討を行った。ウワバイン（ $2 \times 10^{-5}\text{M}$ ）を含むNa洗淨液中における細胞内Na量の減少は，ウワバインを含まぬ場合と比べ緩徐であり（図31），またNa洗淨液がウワバインを含む場合における収縮の減衰は，ウワバインを含まぬ場合と比べ遅かった。以上の成績から細胞内Na量と張力との関係を図33に示した。

Na洗淨液中にウワバインが存在する場合，細胞内Na量の減少は抑制されたが（図31），これはNa洗淨液中にウワバインが存在しない場合にはNaポンプに結合したウワバインが除去されてNaポンプが再活性化し，能動的にNa

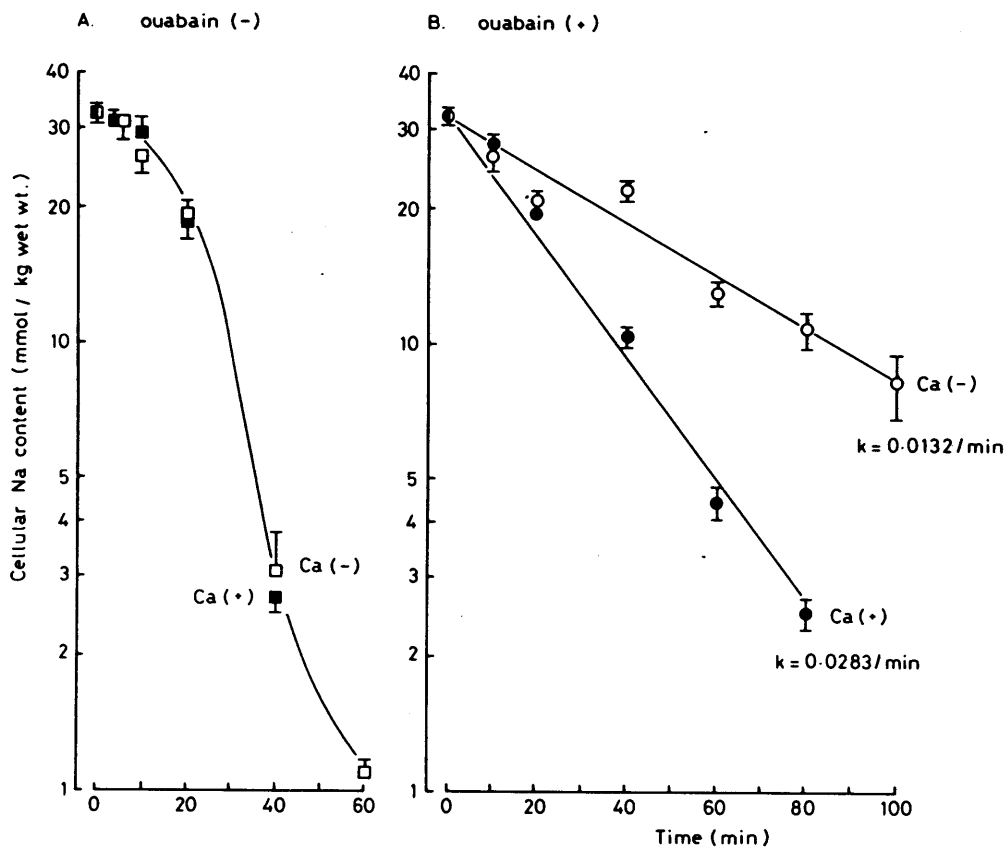


図 31. Na 除去液 (Li 置換) 中における細胞内 Na 量の減少に対する外液 Ca の影響。

ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) を 3 時間処理により Na 負荷した筋を Na 除去液中に移し、経時的に細胞内 Na 量を「低温 Li 法」により測定した。

A : ウワバインを含まぬ Na 除去液中における Na 量の変化。B : ウワバインを含む場合。縦

軸 : 細胞内 Na 量 (mmol/kg)。横軸 : Na 洗淨時間 (min)。n = 6 - 8。

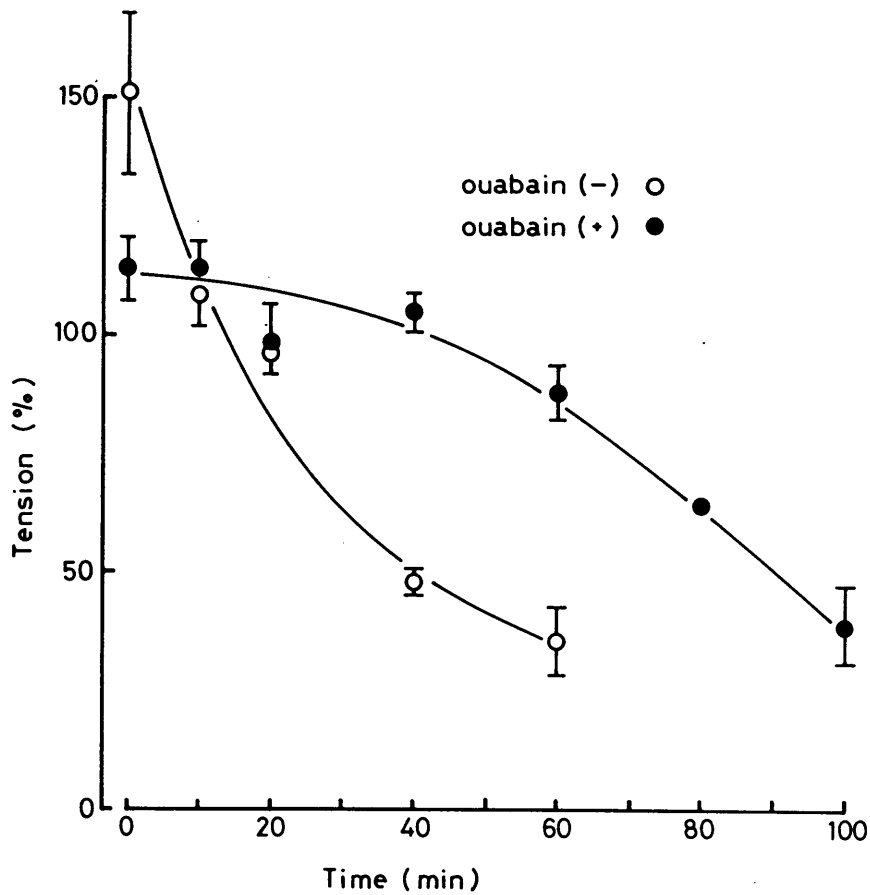


図 32. Na 負荷筋の Na 除去液中への Ca 添加による収縮 (モルモット大動脈)。

Na 負荷筋 (ウワバイン $2 \times 10^{-5} M$ を含む Ca 除去液で 3 時間処理) を Na 除去液 (Li 置換) で洗浄し、各時間に Ca (2.5 mM) を加えて張力を発生させた。(●) : Na 洗浄液にウワバインを含む場合。(○) : Na 洗浄液にウワバインを含まぬ場合。縦軸 : 張力, 横軸 : Na 洗浄時間 (min)。

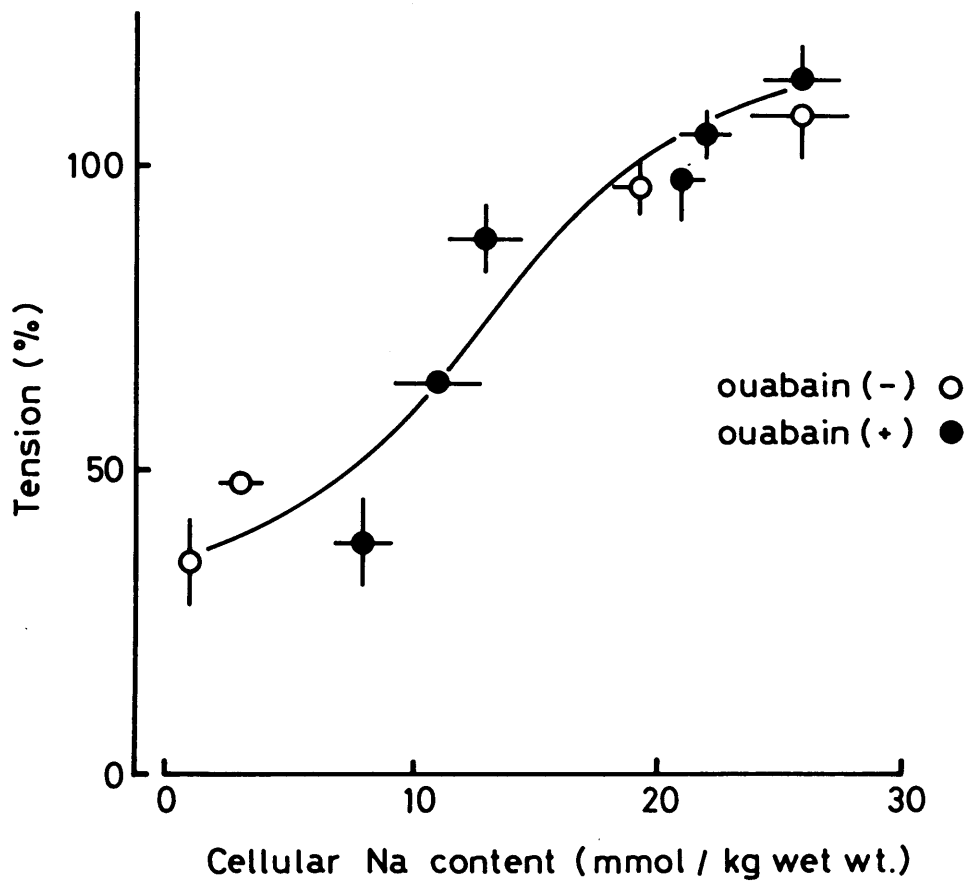


図 33. 細胞内 Na 量と張力との関係 (モルモット大動脈)。

図 32 に示した実験において, Ca 添加により張力を発生させる直前の細胞内 Na 量を「Li 法」により測定し, 張力と細胞内 Na 量との関係を比較した。縦軸: 張力 (%)。横軸: 細胞内 Na 量 (mmol/kg)。

が細胞外へ輸送されたためと考えられる。

3-3-4 細胞内 Na 流出に対する 外液 Ca の影響

次に、この Na 流出に対する外液 Ca の影響について検討した。Na 洗淨液にウワバインが存在しない場合の Na 流出は指数関数的な減少は示さず、また Na 洗淨液に Ca (2.5mM) を添加しても影響はみられなかった。しかし、Na 洗淨液にウワバインを添加し、能動的な Na 排出を抑制した場合の細胞内 Na 量は、指数関数的な減少を示し (速度定数: 0.132 ± 0.0012 /分)、また Ca (2.5mM) の添加によりこの Na 流出の速度は約 2 倍に増加した (速度定数: 0.0283 /分)。

3-3-5 ^{45}Ca 動態

Na 除去液中での ^{45}Ca 取り込みを「低温 La 法」により検討した。まず、塩化コリンで置換し

た Na 除去液中における ^{45}Ca 取り込みを測定したが、正常栄養液中の ^{45}Ca 取り込みと比べ、有意な増加が認められた。筋をウワバインで 3 時間前処置し、その後塩化コリン置換液に移し、 ^{45}Ca 取り込みを測定すると、さらに大きな ^{45}Ca 取り込みの増加が認められた (図 34)。Li 置換液中においては、正常栄養液中と比べ ^{45}Ca 取り込みに変化は認められなかったが、Na 負荷筋の Li 置換液中での ^{45}Ca 取り込みは、コリン置換の場合と同様、有意に増加していた。この増加はベラパミル (10^{-6}M) により影響されなかった (図 35)。

3-3-6 筋弛緩に対する Na 除去液の影響

(1-3-1) においてすでに述べたように、いくつかの組織において Na-Ca 交換機構は、増加した細胞内 Ca を細胞外へ排出するという生理的役割を担っていると考えられている。

(3-1), (3-2) および (3-3) におい

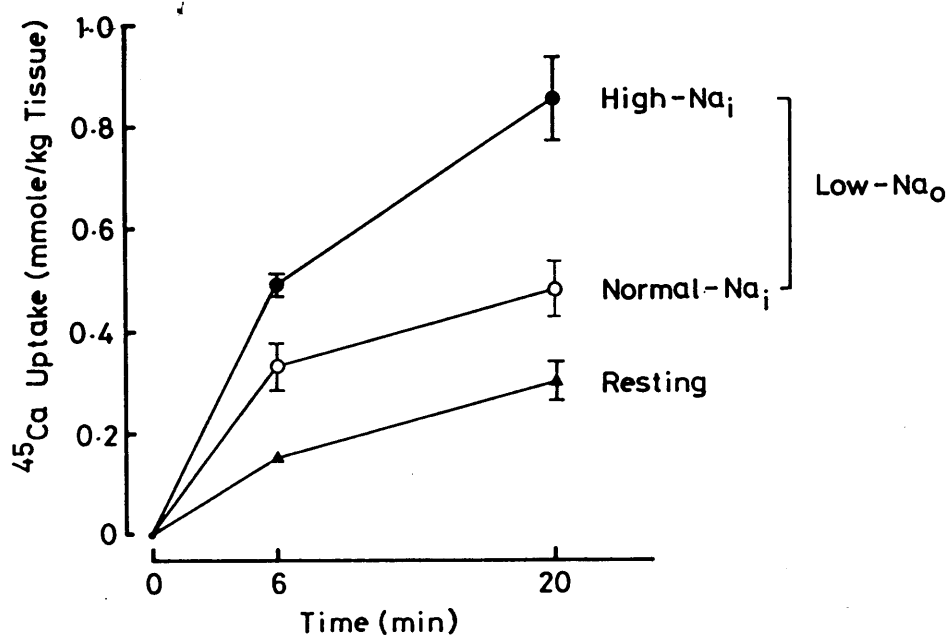


図 34. Na 除去液 (塩化コリン置換) 中における ^{45}Ca 取り込みの時間経過 (モルモット大動脈)。

Na 負荷はウワバイン ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) を 3 時間処理することにより行った。縦軸: ^{45}Ca 取り込み (mmol/kg)。横軸: 時間 (min)。n = 6。

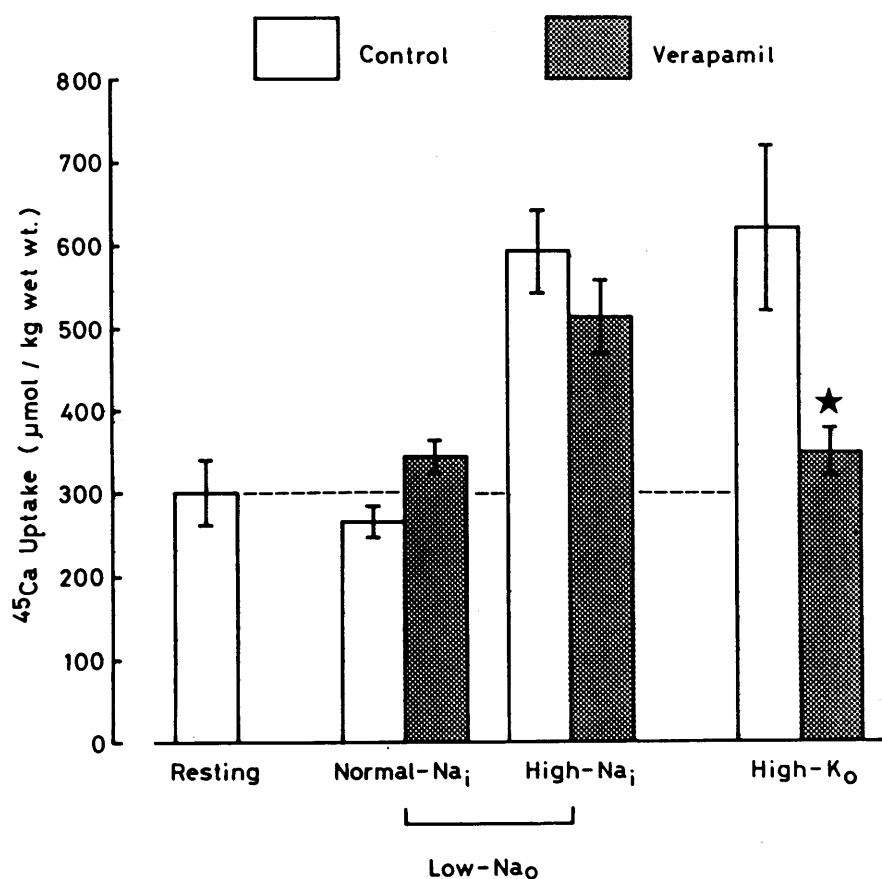


図 35. Na 除去液 (Li 置換) および高濃度 K 液 (65.4 mM) 中における ^{45}Ca 取り込み (20 分間) に対する ヲラパミル (10^{-6}M) の影響 (モルモット大動脈)。

Na 負荷筋はウワバイン ($2 \times 10^{-5}\text{M}$) で 3 時間処理することにより作製した。 ヲラパミルは、 ^{45}Ca 取り込みを有意 ($P < 0.05$) に抑制したが、Na 除去による増加には影響しなかった。 $n = 6 - 8$ 。

ては、Na濃度勾配が減少あるいは逆転した場合の収縮作用について検討してきたが、ここでは筋弛緩時におけるNa濃度勾配の役割について、ウサギ、モルモットおよびラット大動脈を用いて検討を行った。

筋をまず高濃度K液（45.4 mM）で収縮させ、20分後にK（45.4 mM）を残したまま外液のNaをLiに置換した。このLi置換によつて高濃度K液による収縮に変化は認められなかつた。Li置換10分後に、ベラパミル（ 10^{-6} M）あるいは高濃度Kを除去することにより筋を弛緩させた。図36は、モルモット大動脈における弛緩の時間経過を示している。外液のNaをLiに置換することにより、ベラパミルあるいは高濃度Kの除去による筋弛緩の時間経過は延長した。しかしこのような現象は、モルモット大動脈のみにおいて認められ、ウサギおよびラット大動脈においてはNa液およびLi液中で差は認められなかつた（表2）。

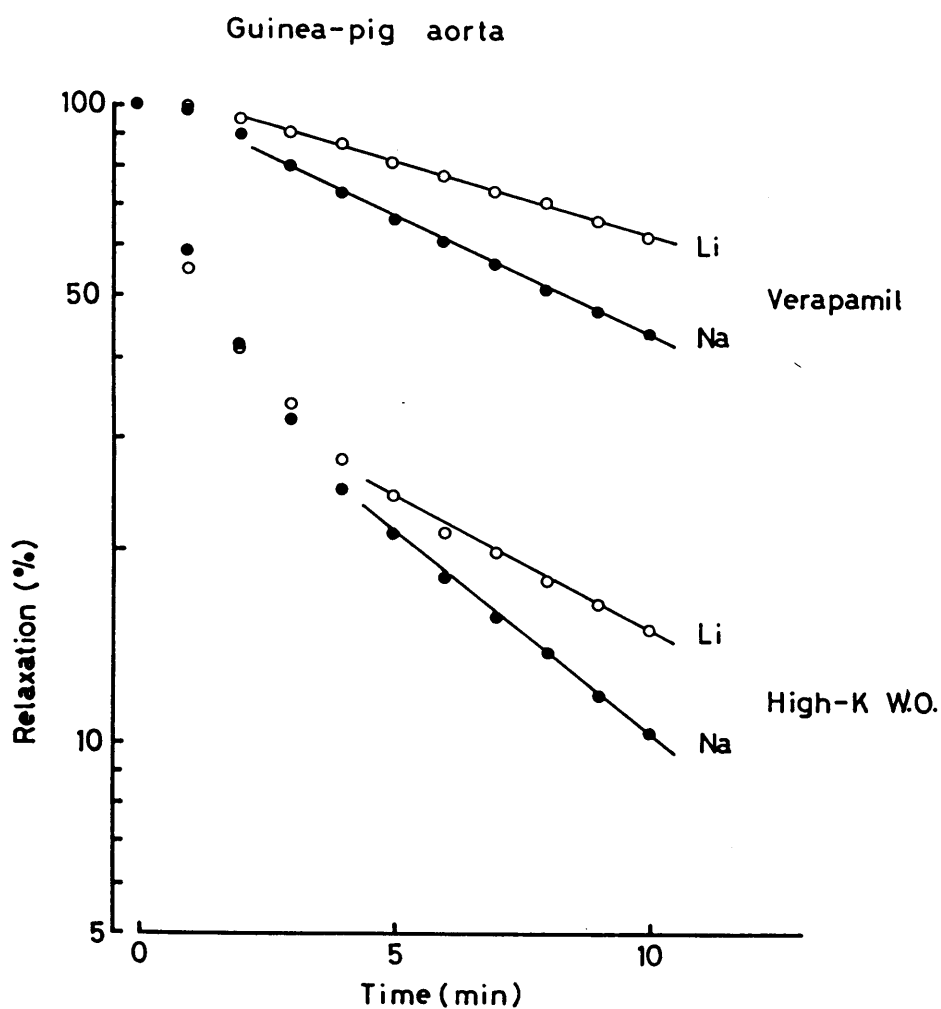


図 36. モルモット大動脈における K 収縮の、ベラパミルおよび高濃度 K 除去による弛緩に対する、Na 濃度勾配の影響。

まず筋を高濃度 K 液 (45.4 mM) で収縮させ、20 分後に外液の Na を Li と交換し、10 分後にベラパミル (10^{-6} M) あるいは高濃度 K を除去することにより弛緩させた。縦軸：弛緩 (%)。横軸：時間 (min)。n = 4。

		Rat	Guinea-pig	Rabbit
Decrease in $[K]_o$	Na	3.0 ± 0.2	4.9 ± 0.2	7.8 ± 1.1
	Li	2.1 ± 0.4	$6.8 \pm 0.3^{**}$	11.3 ± 1.3
Verapamil (10^{-6} M)	Na	2.7 ± 0.1	8.1 ± 1.1	8.7 ± 1.5
	Li	3.0 ± 0.4	$13.5 \pm 1.9^*$	7.7 ± 0.5

** $P < 0.01$, * $p < 0.05$ (min)

表 2. モルモット, ラットおよびウサギ大動脈における, ベラパミルおよび高濃度 K 除去による弛緩に及ぼす, 外液の Li 置換の影響。

数値は, 上記因子による弛緩の *slow component* における半減期 (分) の平均値を示す。

3-3-7 まとめ

〔種差について〕 本節においては、まず各種動物の大動脈に対するNa除去液の収縮作用について検討した。α遮断薬存在下におけるNa除去液(Li置換)の作用には動物種により差が認められ、ウサギ大動脈の感受性がモルモットあるいはラットの大動脈に比べて低いことが明らかとなった。ウワバインあるいはK除去によるNaポンプ抑制に対してもウサギ大動脈の感受性が低いことは、すでに(3-1)で示している。以上のことから血管平滑筋におけるNa除去液およびK除去液による収縮には、共通な機序が関与していることが予想される。

〔Na除去液収縮の性格〕 K除去液の作用について検討した場合と同様(3-1)、Na除去液の作用についてもモルモット大動脈を用いて詳しく検討した。結果を要約すると、

- 1) Na 除去液による収縮の時間経過は、置換物質の種類により異なっていたが、ウワバインの前処置によりいずれの場合も増強された。
 - 2) Na 除去による収縮の大きさは細胞内 Na 量に依存していた。
 - 3) Na 除去液中において ^{45}Ca 取り込み量の増大が認められた。
 - 4) Na 除去液中への細胞内 Na の流出は外液の Ca により促進された。
 - 5) Na 除去液の収縮に対し、有機 Ca 拮抗薬および高濃度 Mg は影響を与えなかった。
- 以上の成績から、モルモット大動脈の Na 除去収縮には、細胞内 Na 量に依存した Ca 流入機構 (Na - Ca 交換機構) が関与していることが示唆された。

(筋弛緩と Na 濃度勾配) 高濃度 K 液による収縮はベラパミルの適用あるいは高濃度 K の除去によりすみやかに弛緩した。ウサギお

よびラット大動脈では，Na除去液はこの筋弛緩に影響しなかった。しかしモルモット大動脈では，Na除去により筋弛緩の速度が有意に抑制され，筋弛緩にNa濃度勾配が部分的に関与することが示唆された。

3-4 ウワバインの特異作用

(1-2-4)においてすでに述べたように，ウワバインをはじめとする強心配糖体はNa, K-ATPase (Naポンプ) に対し強い阻害作用を持ち，生理学あるいは生化学の分野においては「薬理的な道具」として広く用いられている。また強心配糖体の強心効果についても，Naポンプ抑制がその原因ではないかとの説が強い。しかし最近，強心配糖体は，Naポンプの抑制を介さずに直接Ca代謝を変化させることによつて作用をもたらす可能性が指摘され，一般に認められる説となつてきた。本節において

は、このような強心配糖体の「特異作用」が、血管平滑筋においてもみられるかどうかについて、モルモット大動脈を用いて検討した。

3-4-1 正常 Na 液中におけるウワバイン と K 除去液との作用の比較

まず、正常液中におけるウワバインおよび K 除去液による収縮と、細胞内 Na 量との相関を比較した。モルモット大動脈はウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) の適用あるいは K 除去液により約 3 時間後に最大となる収縮をした。収縮の立ち上り速度を比較すると、K 除去液の場合と比べウワバインの例がより速かった (図 37)。この現象はベラパミル ($10^{-6} M$) 存在下でも同様であった。

つぎに、「低温 Li 法」によりウワバインおよび K 除去液による細胞内 Na および K 量の変化を測定した。ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) および K 除去液は細胞内 Na 量を増加させ、また細胞

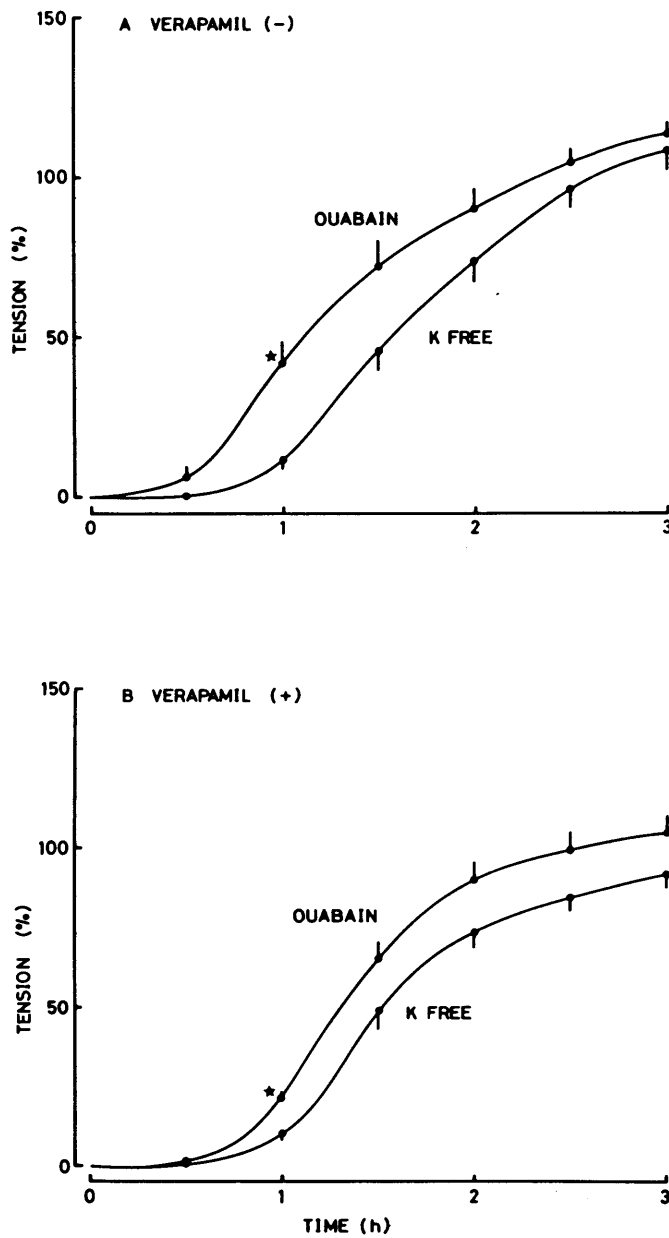


図 37. モルモット大動脈におけるウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) および K 除去液による収縮。

(A) はベラパミル非存在下の収縮。(B) はベラパミル ($10^{-6} M$) 存在下の収縮。縦軸：張力 (%)。横軸：時間 (h)。n = 6。

内K量を減少させた(図38, 39)。これらのイオン含量の変化は張力の発生と対応し、約3時間後に一定となったが、ウワバインおよびK除去液によるNa増加およびK減少の速度に差は認められなかった。この現象はベラパミル存在下でも同様であった。

以上の成績から、細胞内Na量と収縮張力との関係を比較した(図40)。ウワバインは、K除去液と比べ同量の細胞内Na増加でより大きな張力を発生させた。これはベラパミル($10^{-6}M$)存在下でも同様であった。

3-4-2 Na除去液中におけるウワバインとK除去液との作用の比較

前節においては、収縮と細胞内Na量との相関をみることにより、ウワバインとK除去液との比較を行なった。次に、細胞内にNaが蓄積しない条件下、すなわちNa除去液中におけるウワバインおよびK除去液の作用を検討し

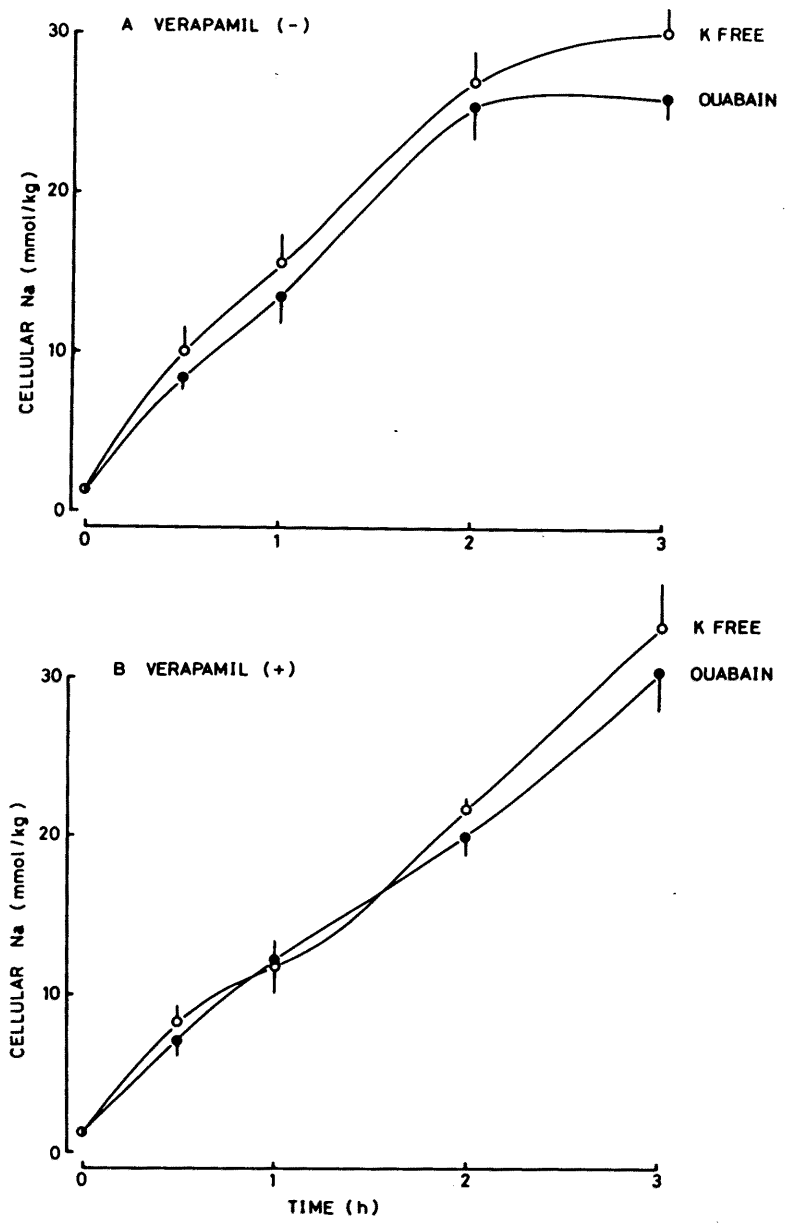


図 38 . 細胞内 Na 量 に対する ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) および K 除去液 の作用 (「低温 Li 法」 により測定 (モルモット大動脈)) 。

(A) はベラパミル非存在下における Na 量 の変化。(B) はベラパミル ($10^{-6} M$) 存在下 における Na 量 の変化。縦軸 : 細胞内 Na 量 ($mmol / kg$) 。横軸 : 時間 (h) 。 $n = 6$ 。

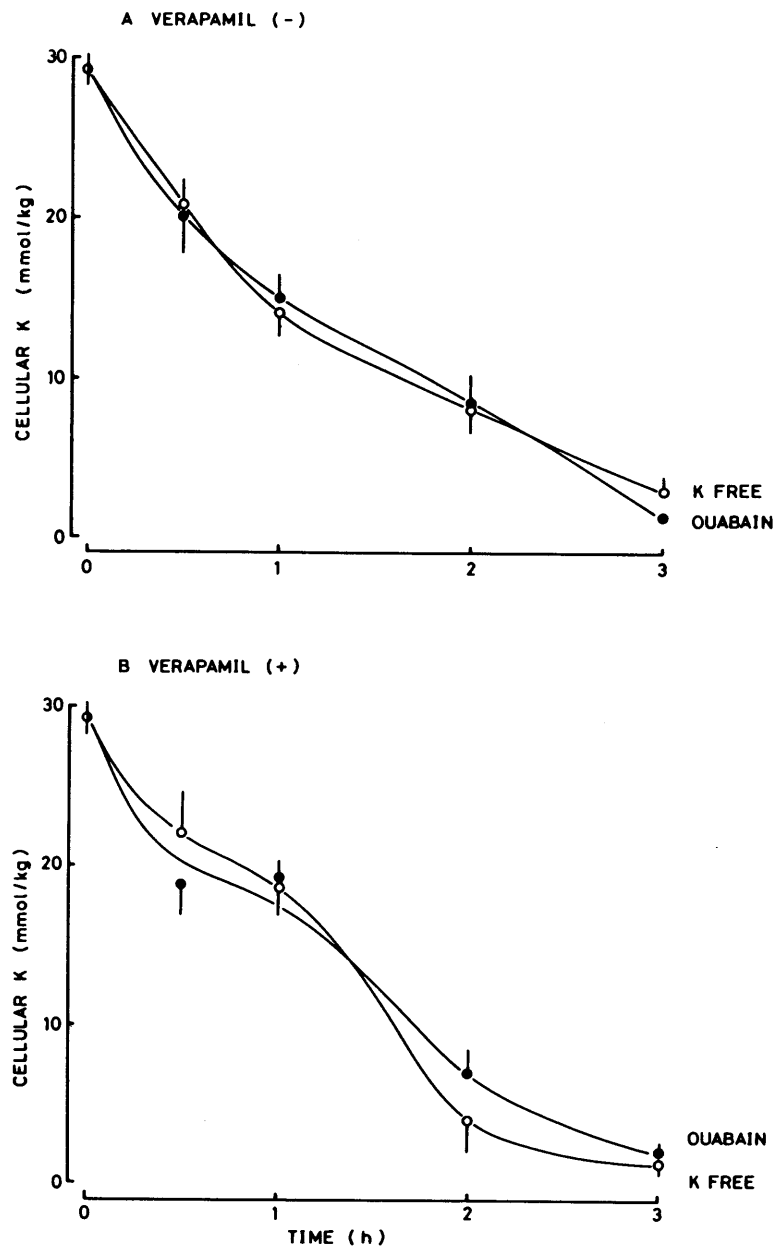


図 39. 細胞内 K 量に対するウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) および K 除去液の作用 (「低温 Li 法」により測定 (モルモット大動脈))。

(A) はベラパミル非存在下における K 量の変化。(B) はベラパミル ($10^{-6} M$) 存在下における K 量の変化。縦軸: 細胞内 K 量 (mmol/kg)。横軸: 時間 (h)。n = 6。

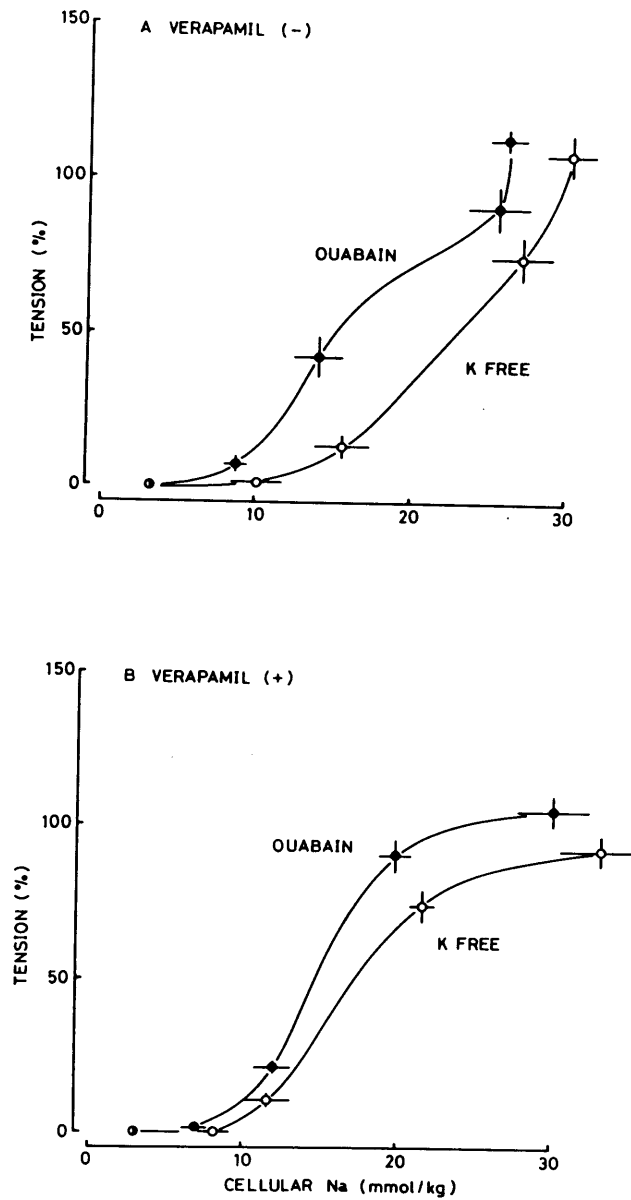


図 40. ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) と K 除去液による張力発生と細胞内 Na 量との関係 (図 37 と 38 より合成した (モルモット大動脈))。

(A) はベラパミル非存在下。(B) はベラパミル ($10^{-6} M$) 存在下における張力と細胞内 Na 量との関係。縦軸：張力 (%)。横軸：細胞内 Na 量 ($mmol/kg$)。

た。

モルモット大動脈に Na 除去液（蔗糖，塩化コリンおよび Li 置換）を作用させると，収縮が発生することは（3-3-2）においてすでに述べた。これらの収縮が安定したところでウワバイン（ $2 \times 10^{-5} M$ ）を適用すると，5分程度の潜伏期の後小さな収縮が発生した（図41）。一方，K 除去液は無影響であった。

次に，Na 除去液（蔗糖置換）中におけるウワバインの収縮作用に対する，各種拮抗薬の影響を検討した（図42）。ベラパミル（ $10^{-6} M$ ）は蔗糖置換液の収縮に影響しなかった。ベラパミル前処置後にウワバイン（ $2 \times 10^{-5} M$ ）を作用させても収縮が発生した。ニトロプルシド（ $10^{-5} M$ ）の前処置によつて蔗糖置換液による収縮はわずかに抑制されたが，ニトロプルシド存在下においてもウワバインを適用することにより収縮が発生した。また，パパベリン（ $2 \times 10^{-4} M$ ）は蔗糖置換液による収縮を抑制したが，パパベリン存在下ではウワバインを添

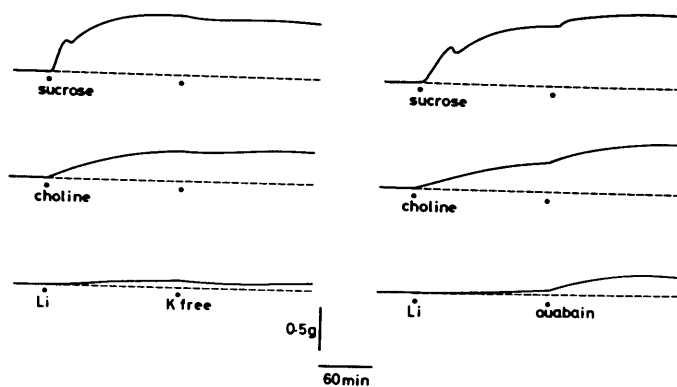


図 41. Na 除去下 (蔗糖, 塩化コリン および Li 置換) における K 除去 および ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) の作用 (モルモット大動脈)。

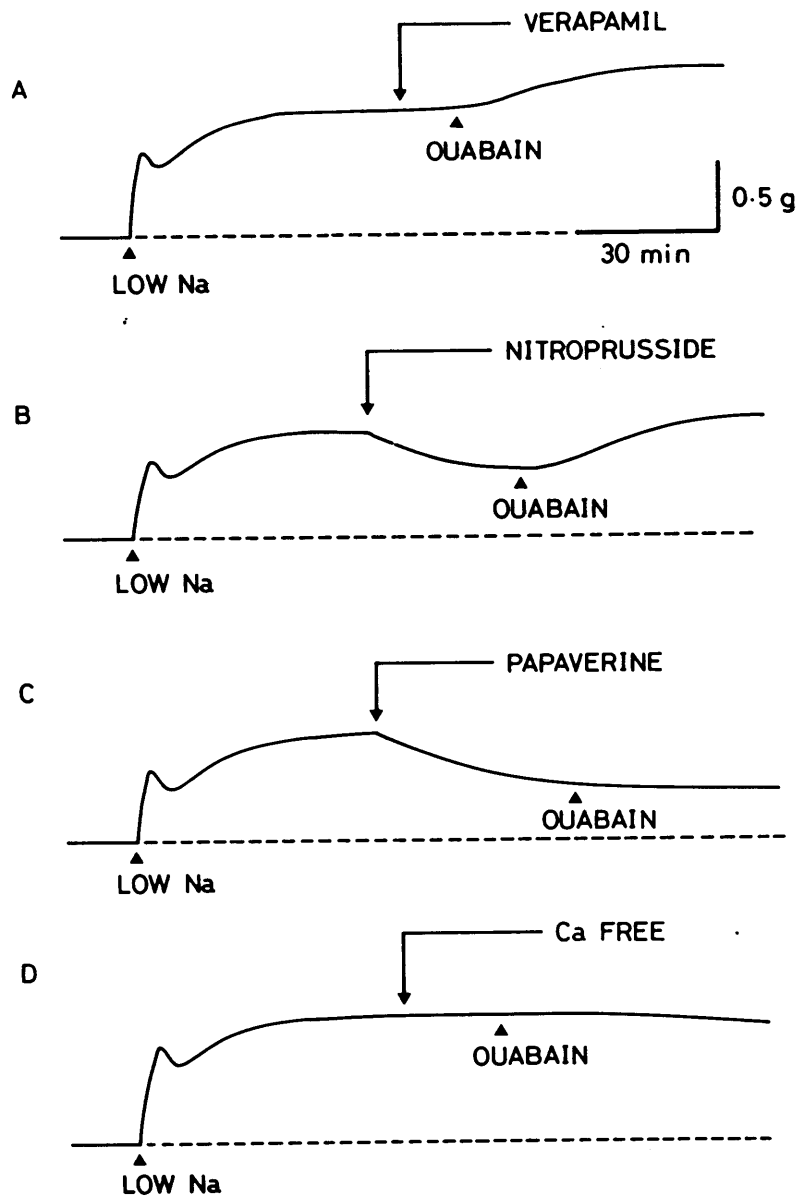


図 42. Na 除去下 (蔗糖置換) におけるウワ
 バイン収縮に対する各種拮抗薬ならびに Ca 除
 去の影響 (モルモット大動脈)。

A : ベラパミル ($10^{-6} M$) , B : ニトロプロ
 シド ($10^{-5} M$) , C : パパベリン ($2 \times 10^{-4} M$) ,
 D : Ca 除去 (EGTA $0.1 mM$) 。

加しても収縮は発生しなかつた。さらにCa除去(EGTA 0.1 mM 添加)によつてもウワバイン収縮は抑制された。

次にNa除去液(蔗糖置換)中における細胞内NaおよびK量に対する,ウワバインおよびK除去液の作用を,張力実験と同様の条件下で検討した。蔗糖置換液により細胞内Na量は,1時間以内に約 $\frac{1}{3}$ に減少した。この時点でウワバイン($2 \times 10^{-5} M$)あるいはK除去液を作用させても,有意なNa量の増加は観察されなかつた(図43)。一方,細胞内K量は,蔗糖置換液によつて1時間以内に約 $\frac{1}{2}$ に減少し,以後2.5時間にわたり一定の値を維持した。1時間後にウワバインを作用させたが,細胞内K量に変化は認められなかつた。しかし,K除去液の場合は,適用2.5時間後の値が対象に比べ有意に低かつた。

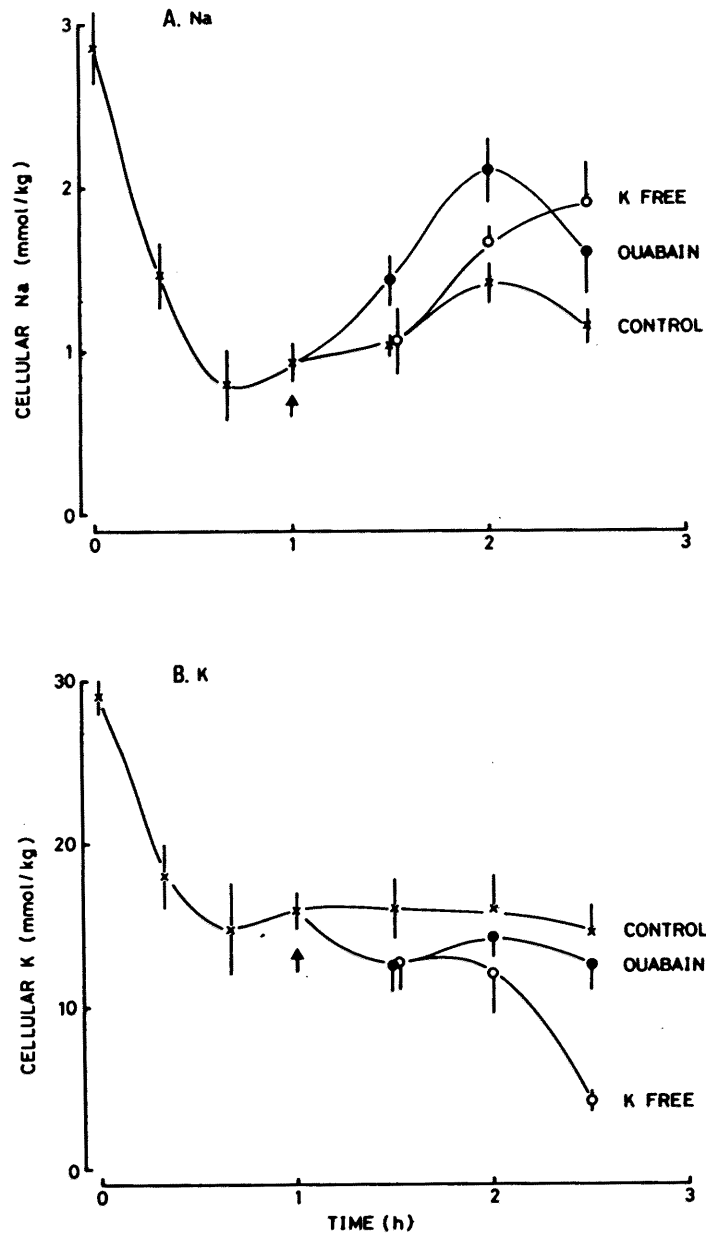


図 43. Na 除去液 (蔗糖置換) 中の細胞内 Na (A) あるいは K 量 (B) に対するウワバイソ ($2 \times 10^{-5} M$) あるいは K 除去の作用 (モルモット大動脈) 。

Na 除去液を作用させた 1 時間後にウワバイソを適用あるいは K 除去を行った。縦軸：細胞内 Na あるいは K 量 (mmol/kg) 。横軸：時間 (h) 。

3-4-3 ま と め

以上，ウワバインとK除去液の作用の比較から，モルモット大動脈に対するウワバインの収縮作用には，細胞内Na蓄積とは関連しない部分が存在することが明らかとなった。しかもこの作用は，ベラパミルによっても抑制されないことから，脱分極に依存する収縮ではないことが示唆された。

ニトロプルシドは，血管平滑筋において，脱分極性の収縮にはほとんど影響を与えないが，ノルエピネフリンによる収縮を強く抑制することが知られている（Kreyeら，1975；Hesterら，1979；Karakiriら，1980）。Na除去液中におけるウワバインの収縮作用が，ニトロプルシドにより影響されなかつたことから，この作用が，ノルエピネフリン様の作用とも性格を異にすることも示唆された。

3-5 実験成績のまとめ

- 1) ウサギ, モルモットおよびラットから摘出した各種の血管平滑筋は, ウワバインあるいはK除去液により収縮を発生した。動脈平滑筋の収縮は, 初期の一過性の収縮とこれに続く後期の持続性の収縮とに分けることができた。
- 2) 初期の一過性の収縮は, α 交感神経遮断薬により抑制されたことから, 血管平滑筋に分布する神経終末からのカテコラミンの遊離に起因するものと考えられた。ウサギの動脈平滑筋では, 他と比べこの成分の割合が多いことが認められた。
- 3) 後期の持続性の収縮は, 平滑筋細胞に対する直接作用により発生するものと考えられ, 細胞内Na量の増加とよく対応していた。この成分はモルモットの動脈平滑筋において顕著に認められた。
- 4) モルモット大動脈における持続性収縮

を詳しく検討したところ、この収縮がNaポンプの抑制とよく対応し、収縮の大きさが $\frac{[Ca]_o}{[Na]_o^2}$ の比に従うこと、また ^{45}Ca 動態に関する実験から、Na-Ca交換機構がこの収縮に関与することが示唆された。

- 5) さらにこの収縮を高濃度K液による収縮と比較したところ、有機Ca拮抗薬および高濃度Mgに対する反応、あるいは、SrのCaに対する代替性に明らかな差が認められた。
- 6) モルモット大動脈を用いて、Na除去液の収縮作用について検討した。Na除去液による収縮の大きさは細胞内Na量に依存し、また収縮時に ^{45}Ca 取り込み量の増加も認められた。さらにこの収縮の有機Ca拮抗薬や高濃度Mgに対する感受性は、Naポンプ抑制による収縮のそれと一致した。
- 7) 細胞内からのNa流出に対する外液Caの影響について検討したところ、Na流出は外液Caの添加により促進された。
- 8) さらに心筋において報告されているウ

ワバインの特異作用について検討を加えた。

ウワバインとK除去液の作用の比較から、

ウワバインには細胞内Naの蓄積と関連しな

い作用のあることが示された。

9) 以上を要するに、血管平滑筋における
強心配糖体の収縮作用には、

a) 組織中に内在する交感神経を介する
作用

b) 平滑筋細胞中へのNa蓄積

c) その他の作用

が関与することが示唆された。

4 考察

4-1 ウワバインおよびK除去液による収縮について

強心配糖体ウワバインおよび栄養液中からのK除去は、各種の動物から抽出した種々の部位の血管平滑筋標本に対し収縮作用を示した。これらの収縮は、主としてNaポンプの抑制に伴ういくつかの要因により発生するものと考えられる。収縮の機序として、1) 内因性カテコラミンの放出、2) 細胞膜の脱分極、3) Na-Ca交換機構、4) 細胞内Naの細胞内小器官への影響、5) 細胞内Kの減少、などの可能性が考えられる。以下、これらの可能性について考察をすすめる。

4-1-1 内因性カテコラミンの放出

臍帯および胎盤に分布する血管を除くすべての血管は、交感神経支配を受けており、 α -アドレナリン作働性作用により平滑筋は収縮する。したがってウワバインあるいはK除去液が交感神経末端に作用して内因性カテコラミンの放出を促進し、収縮を惹起する可能性が考えられる。

本研究においては、このカテコラミンの関与について α 遮断薬、レセルピオン処理あるいは機械的除神経により検討した。その結果、検討した大部分の標本において内因性カテコラミンの関与が認められた。関与の程度は、血管の部位により異なるので一概にはいえないが、ウサギの血管平滑筋においてとくに顕著であつた。その原因としては、1) ウサギの血管平滑筋は交感神経支配が密でカテコラミン含有量が多い、2) 神経末端と平滑筋細胞との解剖学的な距離が近い、3)

平滑筋細胞のカテコラミン感受性が高く、同じ量のカテコラミンが放出されても大きな収縮が発生する、などの要因が考えられる。

1) の神経の分布に関しては、ウサギ、モルモットおよびラットの、胸大動脈のノルエピネフリン含量はそれぞれ $0.26 \sim 0.56$, 0.93 , $0.08 \sim 0.11$ ($\mu\text{g}/\text{gtissue}$) と報告されており (Maxwellら, 1968; Malingら, 1971; Spectorら, 1972), ウサギ大動脈の値が特に高いということはない。一方,

3) の平滑筋の感受性に関しては、ウサギ、モルモットおよびラットにおける外因性のノルエピネフリンによる収縮作用の ED_{50} はそれぞれ約 $5 \times 10^{-8} \text{M}$, $5 \times 10^{-7} \text{M}$, $5 \times 10^{-9} \text{M}$ と報告され (Karakura, 1978), これらの中ではラット大動脈の感受性が高い。以上の知見から、1) および 3) が関与している可能性は小さいと考えられるが、2) の解剖的な距離に関する報告は現在のところ見あたらない。

(1-3-2) においてすでに詳しく述べたように、これまで血管平滑筋を用いて行われて

きた強心配糖体およびK除去液に関する研究の大部分においては、内因性カテコラミンが関与することが気付かれていなかっただ。これは平滑筋研究の中で、血管平滑筋についての研究の歴史が浅かったこと、あるいは交感神経終末もしくは伝達物質の研究と平滑筋の研究との間の連携の悪さによるものと考えられるが、当時神経分泌細胞に対する強心配糖体などの作用についての研究がまだ充分になされていなかっただことにも原因があると思われる。

カテコラミン分泌細胞における強心配糖体の体系的な研究は、Banks (1967) により最初に行われたと思われる。彼は、ウシの副腎を用いウワバインのカテコラミン分泌増加作用を観察しているが、この分泌増加作用は外液のCaに依存すること、また組織K量減少との対応からNaポンプ抑制と関連することを報告している。以後、カテコラミン分泌に対するNaポンプ抑制の作用については、副腎 (Garcia

ら, 1980; Esqueroら, 1980; Garciaら, 1981), 精管 (OzawaとKatsuragi, 1974; Nakazatoら, 1978, 1980), 心臓 (LindmarとLöffelholz, 1974), 脾臓 (GarciaとKirpekar, 1973a, b) などを用いて行なわれている。一般に, 筋収縮ばかりでなく, 伝達物質の放出も神経細胞内の遊離Ca濃度の増加が原因となっていることが知られているが, カテコラミン分泌に対する強心配糖体の作用機序として, Na-Ca交換機構の関与をあげるものが見られる (Nakazatoら, 1978; Garciaら, 1980)。しかしこれらの示唆は, NaやCa動態を直接測定して得られた成績に基づく結論ではなく, 単なる推測にすぎない。

4-1-2 細胞膜の脱分極の関与

平滑筋細胞膜には, 他の興奮性細胞と同様に, Naポンプにより作られるNa, KおよびClの濃度勾配並みに細胞膜の選択的イオン透過性 ($P_K < P_{Ca} < P_{Na}$) により細胞内を負とする静止膜

電位が存在している（平衡電位）。骨格筋や心筋の静止膜電位は -90 mV 程度であるのに対して、平滑筋の電位はやや浅く $-50\sim-60\text{ mV}$ であるといわれている（Casteels, 1970; Jones, 1980; Casteels, 1981）。一方、(1-2-3) すでに述べたように、NaポンプにおけるNaとKの交換比は3:2であることから、Naポンプ自体が発電作用を有し、細胞膜電位を深くする働きをもっている。そしてこの平滑筋の膜電位における発電性Naポンプの関与は、数mVから10数mVといわれている（Thomas, 1972; Fleming, 1980）。

以上のことから、平滑筋に対し強心配糖体あるいはK除去液を作用させNaポンプを抑制すると、上記の2つの要素により脱分極がおこり、これによりCa透過性が増大し収縮が発生することが考えられる。本研究においては、膜電位の測定は行わなかったが、細胞膜の脱分極により発生すると一般に考えられている高濃度K収縮と対比することにより、細胞膜

脱分極の関与について検討を行った。その際、有機Ca拮抗薬の特異的な薬理作用に注目し解析を行ったので、まずこの薬物の概要について触れることにする。

冠状血管拡張薬として用いられているベラパミル、D600、フレニラミン、ニフェジピンあるいはジルチアゼムといった一群の薬物は、細胞膜のCaチャンネルを抑制することが知られ、有機Ca拮抗薬として分類されている。Ca拮抗薬という分類は、Fleckenstein (1964) が、心筋にベラパミルおよびフレニラミンを作用させてちようどCa除去と同じような効果を観察したことに始まったといえる。心筋細胞膜にはNaを通すfast channelとCaを通すslow channelが存在するが、その活動電位はslow channelを介して流れるCaの内向き電流に大きく依存することが知られている。上記の有機Ca拮抗薬は、このCaの内向き電流をNa電流に影響することなく抑制し、またこの効果は外液のCa濃度を増加することにより拮抗されることが明らかとな

っている (Fleckenstein, 1977; Fleckenstein, 1981)。

一方, 有機Ca拮抗薬は, 種々の平滑筋の収縮にも強い拮抗作用をもつことが示されている。これは, 平滑筋のCaチャンネルがこれらの薬物により抑制されることが原因と考えられている。現在では平滑筋におけるCaチャンネルは, 二種類に大別されている (Bolton, 1979a, b; Rosenburger と Triggle, 1978)。一つは膜電位依存性Caチャンネル (Voltage-sensitive Ca channel) で細胞膜の脱分極により活性化される。もう一つは, 受容体作働性Caチャンネル (receptor-operated Ca channel) でこれは膜電位の影響を受けにくく, 特定の薬物の受容体への結合により活性化される。そして有機Ca拮抗薬は, 少なくとも血管平滑筋においては, これら二つのCaチャンネルのうちで膜電位依存性Caチャンネルを選択的に抑制することが明らかとなっている (Weiss, 1981; Godfraind, 1981)。

この現象はウサギ大動脈平滑筋における高濃度Kとノルエピネフリン収縮に対する有機

Ca拮抗薬の作用の差にも見ることができ（鹿木, 1981）。ウサギ大動脈の高濃度K収縮は外液のCaを除去することによりすみやかに消失することから、膜電位依存性Caチャンネルを介するCaの流入により発生すると考えられている。一方、ノルエピネフリンはCa除去液中で一過性の収縮を発生させることから、この部分は細胞内Caの遊離により発生すると考えられている。そしてノルエピネフリン収縮の持続性の部分は、外液のCaに強く依存しており、これは受容体とこれと関連したCaチャンネルを介するCa流入により発生するものと考えられている。ベラパミルあるいはD600などの有機Ca拮抗薬は、高濃度K収縮を強く抑制するが、ノルエピネフリン収縮の持続性の部分にはほとんど影響しない。しかし、このような有機Ca拮抗薬の特異性も、動物種あるいは血管の部位が変わると減弱することも報告されている（GolenhofenとHermstein, 1975; van Breemenら, 1981）。さらに血管平滑筋以外の平滑筋, 例

えば腸管平滑筋においては，有機Ca拮抗薬はほとんど特異性を示さない。

モルモット大動脈における高濃度K収縮は，ベラパミルの前処置あるいは後処置により強く抑制を受け，また高濃度K液中でのCaの添加による収縮も同様に強く抑制された。高濃度K液とは異なる機序（K透過性の抑制）で細胞膜の脱分極をもたらし収縮を発生させる，TEAあるいはBaに対しても，ベラパミルは強い抑制作用を示した。また，高濃度K液中での⁴⁵Ca取り込みの増加もベラパミルにより拮抗された。一方，ノルエピネフリン収縮に対しては，ベラパミルはほとんど抑制作用を示さなかつた。このようにモルモット大動脈のCaチャネルの性格は，ウサギ大動脈平滑筋で得られた知見と，よく一致していた。

モルモット大動脈のウワバイソあるいはK除去液による収縮は，ベラパミルの前処置あるいは後処置によつて影響されず，また⁴⁵Ca取り込みの増加も抑制されなかつた。このこ

とは、ウワバインあるいはK除去が脱分極性収縮とは異なる機序により収縮を発生させることを示している。高濃度K液による収縮との差は、これ以外にNaに対する依存性の差(3-2-2)、高濃度Mgに対する感受性の差(3-2-4)、Srの代替性の差(3-2-5)などにも示されている。

しかし、モルモット大動脈におけるウワバインあるいはK除去液による収縮に、脱分極がまったく関与しない訳ではなく、一部には脱分極性の要素が潜在している可能性がある。例えば、K除去液中のCa収縮においては、正常なCa濃度下(2.5mM)では抑制作用は認められなかったが、低濃度のCaによる収縮はわずかにあるが有意に抑制された(3-2-3)。また、K除去液収縮のK再添加による弛緩は初期の急速な弛緩とこれにつづく緩徐な弛緩の二つの相から成り立っていたが(3-2-1)、初期の急速な弛緩は、発電性Naポンプの再活性化に起因する細胞膜の再分極によるものと

考えられる。〈実験成績〉中には記載しなかつたが、ウサギ大動脈標本において、ウワバインは急速な立ち上りの小さな収縮を発生させる例が、一部に認められた。この収縮は、フェントラミンでは抑制されなかつたが、ベラパミルで抑制された。

4-1-3 Na - Ca 交換機構の関与

平滑筋における Na - Ca 交換機構の研究の経緯については、すでに序章で詳しく述べたが、とくに血管平滑筋においては、収縮反応の研究において内因性カテコラミンの関与を見落とすという誤りがあつた。本研究においては、この Na - Ca 交換機構の収縮への関与の可能性を中心として実験を進めてきた。以下、Na - Ca 交換機構の関与を想定して行つた実験より得られた成績を要約する。

- 1) Na ポンプ抑制に伴う収縮の発生は細胞内 Na の蓄積とよく対応していた。

- 2) 収縮は脱分極あるいは α 作用による収縮とは明らかにその性格を異にしていた。
- 3) 収縮の大きさは、外液のCa濃度のみでなくNa濃度にも影響され、 $[Ca]_o/[Na]_o^2$ の比にしたがっていた。
- 4) 細胞内Na量の増加に伴い ^{45}Ca 取り込み量の増加が認められた。
- 5) 細胞内にNaを蓄積した後、外液のNa濃度を減少させてNa濃度勾配を逆転させると、さらに大きな収縮が発生し、その収縮の大きさは細胞内Na濃度に依存していた。このとき ^{45}Ca 取り込みの増加が認められた。
- 6) 細胞外液のCaに依存したNa流出がみられた。

以上の成績は、これまで提唱されたNa-Ca交換機構の理論とさわめてよく対応しており、血管平滑筋にもNa-Ca交換機構が存在し、これがNaポンプ抑制に伴う収縮に関与している

ことが示唆された。

細胞内 Na 濃度の上昇が収縮をもたらし、これに Na - Ca 交換機構が関与する場合に問題となるのは、Na (流入) - Ca (流出) の型の Na - Ca 交換が抑制されたことによるのか、あるいは、Ca (流入) - Na (流出) の型の Na - Ca 交換が促進されたことによるのか、または、両者が混在しているのかということである。前者の考え方は、Na - Ca 交換機構を Ca 排出機構としてとらえるもので、Na 濃度勾配に従う Na の動きを駆動力として Ca を細胞外へ排出する機構を想定し、これが Na ポンプ抑制に伴い Na 濃度勾配が減少したことにより抑制されて細胞内 Ca 濃度が増大したと考える。後者は、Na 濃度勾配よりもむしろ Ca 濃度勾配を一義的に考え (実際、Na 濃度勾配に比べ Ca 濃度勾配の方がより深い)、Ca 濃度勾配に従う Ca の流入を細胞内 Na の増加が促進すると考える。すなわち Na - Ca 交換機構を積極的な Ca 流入機構とみなす考え方である。

本実験成績からは、血管平滑筋におけるウ
ワバインやK除去液収縮には後者、すなわち
Ca（流入）- Na（流出）の型のNa-Ca交換機
構がより重要であると考えられる。その理由
として、1) Na負荷した筋におけるCa収
縮の立ち上り速度が、高濃度Kやノルエピネ
フリンなどの収縮薬を投与したときの収縮の
立ち上り速度に匹敵するほど速く、受動的な
Caの流入によるとは考え難いこと、および
2) 外液のNaを他の置換物質に換え、Na濃
度勾配を減少させた場合（特にLi置換の場合
）の収縮はNa蓄積によりNa濃度勾配が減少し
た場合に比べ小さいこと、などが挙げられる。
Tillischら（1979）は、心筋において $[Ca]_i$ と
 $[Na]_i$ の比を変えた場合の収縮速度の変化が
一過性に終ることに着目し、収縮発生におい
て、 $[Ca]_i$ と $[Na]_i$ の比よりもむしろ細胞内
Naの絶対量が重要な役割を果すことを示唆し、
Ca（流入）- Na（流出）の型のNa-Ca交換機
構の重要性を強調している。しかし、平滑筋

におけるこの問題についてはさらに詳細な検討が必要と思われる。

本研究では、血管平滑筋における Na - Ca 交換機構の性格について、1) Na - Ca 交換担体 (carrier) の陽イオンの認識性 2) Ca 拮抗薬などの作用 3) Na と Ca の交換比について検討を行った。以下これらの点について考察を行う。

ヤリイカなどの軟体動物の巨大神経における Na - Ca 交換担体の Na 結合部位に対しては、K, Li, コリンはまったく結合することができず、したがって、これらの物質を用いた Na 置換液により Na 除去の効果を得ることができると (Baker, 1972)。血管平滑筋においても、上記の Na 置換物質を用いた Na 除去液により収縮が発生し、また ^{45}Ca 取り込みの増大がみられたことから、血管平滑筋における Na - Ca 交換担体の Na 結合部には、上記の陽イオンは結合し得ないものと考えられる。

一方、Na - Ca 交換担体に対する 2 価陽イオ

ソの親和性については、MgとSrについて検討を行った。K除去液収縮およびNa除去液収縮は、高濃度Mgにより影響を受けず、また ^{45}Ca 取り込みについても同様であった。一方、SrはK除去液収縮におけるCaに対して代替作用をもつことが明らかにされた。すなわち血管平滑筋におけるNa-Ca交換担体のCa結合部位には、Srは結合するがMgは結合できないものと考えられる。MgのNa-Ca交換担体に対する結合については、心筋マイクロゾーム分画（Bersら、1980）、培養心筋細胞（WakabayashiとGoshima、1981a、b）において検討されているが、これらの組織においては、Mgは弱いながらNa-Ca交換担体に対し親和性をもつという。一方、Srの結合性については、軟体動物の巨大神経（Baker、1978）、培養心筋細胞（WakabayashiとGoshima、1981a）において認められている。

本研究においては、Naポンプ抑制による収縮あるいはNa除去液による収縮が、脱分極収

縮と異なるものであることを、有機Ca拮抗薬を用いて解析した。その結果、これらの収縮あるいは収縮時の ^{45}Ca 動態に対し、ベラパミルなどの有機Ca拮抗薬は抑制作用を示さないことが明らかとなった。このことは視点をかえれば、Na-Ca交換機構は有機Ca拮抗薬で抑制されない性格のCa輸送機構であるといえる。ヤリイカの巨大神経におけるNa-Ca交換機構も、Ca拮抗薬により抑制されないことが最近報告された (Baker, 1978)。

ところで本研究を進めるにあたっては、「Na-Ca交換機構を特異的に抑制する物質」の検索を行った。しかし残念ながらそのような物質を見いだすことはできなかった。今後そのような物質が発見あるいは開発され、Na-Ca交換機構の解析に使われることが期待される。

(1-3-1) において述べたように、いくつかの組織におけるNa-Ca交換機構のNaとCaの交換比は当初考えられていた2:1より高い

のではないかといわれている。血管平滑筋において、ウワバインあるいはK除去の収縮の大きさは、 $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比に従ったことから、血管平滑筋のNa-Ca交換機構のNaとCaの交換比は、一応2:1と考えることができる。しかしこの場合、収縮の大きさが遊離の細胞内Ca濃度と比例することを前提しており、もし筋収縮が、収縮の大きさと遊離Ca濃度との間に直線関係が成立しないところでおこっているとすれば、そのように結論することはできない。今後、収縮と膜電位との関係について研究を進め、交換比を決定する必要があると思われる。

4-1-4 細胞内Na蓄積にともなう細胞内小器官のCa代謝の変化

平滑筋の細胞内Na濃度は、他の興奮性細胞と同じようにNaポンプにより低く保たれている。すなわち生理的な状態における細胞内の

Ca代謝は低Na濃度下で行われている。したがってNaポンプが抑制され細胞内のNa濃度が増加することにより、細胞内小器官のCa代謝が影響を受ける可能性が考えられる。

筋組織において、Caを結合あるいは取り込む機能を有する小器官として、まず筋小胞体を挙げる事ができる。筋小胞体は筋線維をとりまく袋状の細胞内膜系であるが、この膜にはCa-ATPase (Caポンプ)が存在し、ATPの加水分解に共役してCaを膜内に能動輸送している。筋小胞体膜におけるCa-ATPaseの含量は全膜蛋白質の60~70%に達するといわれている。この酵素系によるCa取り込みはきわめて低い濃度 ($10^{-8} \sim 10^{-6} M$) の外液Caにより活性化される。このCa取り込みにより小胞体内のCa濃度は外液の500~6000倍に達するが、一部は小胞体の内面に存在するCa結合蛋白質に結合している (Tadaら, 1978)。骨格筋における興奮収縮連関においては、筋小胞体からのCaの遊離およびCaの再取り込みが重要な役割をはた

しているといわれている (Ebashi ら, 1969 ; Ebashi, 1976)。心筋においては, 細胞外からの Ca の流入が収縮の引き金となるが, 筋小胞体からの Ca 遊離および再取り込みが主要な役割をはたすことは, 骨格筋と同様である (Fabiato と Fabiato, 1979 ; Chapman, 1979)。

一方, 平滑筋にも筋小胞体が存在するが, 骨格筋や心筋に比べて発達が悪い (Garfield と Somlyo, 1977 ; Gabella, 1981)。したがってその生理的意義については不明な点が多い。Dransfeld ら (1969) は, 心筋由来のマイクロゾーム分画 (筋小胞体を多く含む) の Ca 取り込みに対し, Na が抑制的に作用することを報告している。子宮平滑筋においても同様に, マイクロゾーム分画の Ca 取り込みが Na により抑制されているという (Crankshaw ら, 1977)。平滑筋収縮において, 筋小胞体が何らかの役割をはたしているとすれば, これに対する Na の影響を考慮する必要がある。

Ca 代謝を担うもう一つの細胞内小器官とし

て、ミトコンドリアを挙げる事ができる。ミトコンドリアは内外2層の膜をもつ小器官であるが、この器官はエネルギー産生器官としての役割の外に、Caを多量に取り込む性格をもっている。しかしCa取り込みを活性化する外液のCa濃度は $5 \times 10^{-6} M \sim 10^{-4} M$ 程度で筋小胞体の場合と比べて高い。ミトコンドリアのCa取り込みについては不明な点も多いが、一部はCa-ATPaseによる能動輸送によるものであり、一部は電子伝達にともなう水素イオンの動きと共役した型で行なわれると考えられている。

一方、ミトコンドリアのCa取り込み機能の生理的役割はよく判っていない。心筋においては、少なくともbeat to beatに対応するミトコンドリアのCa取り込みおよび遊離機能については否定的な見解が多い(Scarpa & Graziotti, 1973; Schlafferら, 1972)。その理由としては、ミトコンドリアのCa取り込み速度が遅いこと、またCa取り込みを行なう外液Ca濃度が生理的濃度よりも高いことなどが挙げられている。しかし例えば

虚血心, アノキシア心および種々の実験的不全心におけるミトコンドリアのCa取り込み機能変化に異常が認められることから, ある病的な状態における心筋収縮に, ミトコンドリアが何らかの関与をしている可能性が考えられている(上埜ら, 1977)。平滑筋収縮においてもミトコンドリアの生理的意義についての論議がなされているが, 否定的な見解もある(SomlyoとSomlyo, 1981)。ミトコンドリアに対するNaの作用としては, マトリックス内からのCa遊離を促進する作用を挙げることもできる。このCa遊離はNaとCaの交換輸送(Na-Ca antiporter)という型で行なわれる(FiskumとLehninger, 1980; Racker, 1980)。しかしこの現象には臓器特異性が存在し, 脳, 副腎皮質, 骨格筋, 耳下腺などの器官から調製したミトコンドリア標本には認められるが, 肝, 腎, 肺, 子宮および回腸の平滑筋などのミトコンドリアには認められないという(Cromptonら, 1978)。

前節で述べたように、血管平滑筋における強心配糖体の収縮作用には、細胞膜におけるNa-Ca交換機構の関与が重要であると考えられるが、筋小胞体やミトコンドリアのCa代謝に対するNaの作用が収縮の一部に関与している可能性も残されており、今後の検討が必要と思われる。

4-1-5 細胞内Kの流出

ウワバインやK除去液による細胞内Kの流出が、Ca動態を変化させる場合、K-Ca交換機構が関与する可能性を考える必要がある。この機構はMoradとGreenspan (1975)により提唱されたが、LindenmeyerとSchwartz (1975)により強心配糖体の作用に関していっていないのかとの示唆がなされた。しかし、現在のところこの仮説についてはまだ実験的な証明がなされていない。Poole-WitsonとLanger (1975a, b)は、呼吸性アシドーシスによりK流出を

抑制した状態でも，強心配糖体の強心効果がみられることから，この仮説を否定している。平滑筋においても K - Ca 交換機構の存在を示唆する報告はなされていない。

一方，Ca 代謝機構以外への影響としては，解糖に必要なパイルベートキナーゼ活性に対するものが考えられる。この酵素はホスホエリールピルビン酸のリン酸基が ADP に転移して ATP とピルビン酸を生じる反応を触媒する酵素で，この酵素の活性には Mg と K の二つのイオンが必要である（生化学第 4 版：コーンスタンプ° p.262 より）。しかし平滑筋においてエネルギー代謝の抑制はむしろ筋弛緩と関連すると考えられる。

4-2 Na除去液による収縮について

4-2-1 Naの置換物質について

本研究では、血管平滑筋の張力におけるNa濃度勾配の役割をさらに明らかにする目的で、Naポンプ抑制の作用に加え、Na除去液の作用について検討を行った。Na除去液は、瞬時にNa濃度勾配を減少あるいは逆転させることが可能であるが、Na置換物質自体の影響を常に考慮する必要がある。栄養液からNaを除去する場合、目的に応じて種々の置換物質が用いられるが、一般によく用いられているものとしては蔗糖、塩化コリン、トリスハイドロキシアミノメタン（トリス）およびLiClなどがある。以下これらの置換物質を用いて調製したNa除去液の影響について考えてみたい。

蔗糖は生体に対し不溶性な物質であるため、最も頻繁に用いられるが、溶液中のイオン強

度が減少すること，あるいは蔗糖は細胞膜を通過しないために細胞内から水が流出して細胞容積が減少するなどの欠点がある。蔗糖置換液はCa除去液中でも持続性の収縮を発生させたが，このような現象には上記の要因が関与している可能性が考えられる。

塩化コリンは，効力は弱いコリン作働性薬の一つでもあり，これを用いる場合はコリン作働性遮断薬（アトロピンなど）の存在を必要とする。コリン置換を行う場合は蔗糖の場合と異なり塩素イオンの減少は伴わないが，いくつかの平滑筋細胞において脱分極作用を示すことが報告されている（CasteelsとRaeymaekers, 1977; DroogmansとCasteels, 1979）。モルモット大動脈のコリン置換液による収縮は，膜電位依存性Caチャンネルの遮断薬であるベラパミルにより抑制されたが，このことは上記の知見を支持するものと思われる。

トリスはPHの緩衝系として広く用いられている物質であるが，Na置換物質としても用

いられる。しかしトリスは、Na, K-ATPase 活性を抑制するという報告 (Kidwai, 1977), あるいはミトコンドリアの電子伝達系を抑制するとの報告 (Yamashitaら, 1971) がある。さらに平滑筋の収縮性を抑制するという報告 (Tur-Lapatyら, 1978; 1979a, b) があり, 本実験では使用しなかった。しかし現在では, トリスは平滑筋に対し抑制作用を持たないことが明らかとなっている (Karakura, 1981a, b)。

LiはNaと同様一価の陽イオンであり, 物理的な性質という観点に立てば, 問題の少ない置換物質といえる。しかしLiのイオン半径は 0.64 \AA でNa(0.96 \AA)のそれと近似しており, 例えばLiはNaチャンネルを通過できるといった現象がよく知られている (吉岡と竹中, 1979)。
したがって外液のNaをLiに置換しても, かならずしも実質的にNa除去の効果を示さぬ場合があり得る。しかしNa-Ca交換機構におけるNa作用部位において, Liは代替作用を持たないことが示されている (Blaustein, 1974)。

4-2-2 Na - Ca 交換機構の関与

以上述べたように、外液の Na を種々の Na 置換物質に置換することには多くの問題がある。本研究においては、数種の Na 置換物質を用い、その作用を比較した。これらの Na 置換液は、様々な性格をもつ収縮を発生したが、Na 負荷によりいずれの置換物質の場合も収縮が増強された。このことは Na 除去液による収縮のなかで、少なくとも Na 負荷により増強された部分は、外液の Na 除去の効果によるものと考えられる。本実験では、この負荷の影響が最も顕著に見られる Li 置換の作用について詳細に検討し、以下の成績を得た。1) Li 置換液による収縮の大きさは、細胞内 Na 量に依存し、また外液の Ca にも依存していた。またこの収縮は膜電位依存性の Ca チャンネル抑制薬であるベラパミルあるいは高濃度 Mg により抑制されなかつた。2) Li 液中では ^{45}Ca 取り

込みの増大が認められた。3) 細胞内 Na の Li 液中への流出は細胞外の Ca により促進された。

以上の成績は、細胞内 Na の細胞外への流出と、細胞外 Ca の細胞内への流入が共役している可能性を示唆している。さらにこれらの成績は、ウワバインあるいは K 除去液により Na ポンプ活性を抑制し、細胞内に Na を蓄積させた場合の成績と一致する点が多く、両者の収縮が同一の機序により誘起されていることが示唆された。以上のことから、血管平滑筋には Na - Ca 交換機構が存在し、この機構が平滑筋収縮に関与していることが結論される。

4-3 Na - Ca 交換機構の生理的役割

今日では、興奮性細胞ばかりでなく電気生理学的に不活性である細胞にも Na ポンプが存在し、Na および K の濃度勾配が形成されていると考えられている。一方、このようなイオンの偏在は Ca についても成り立っている。すなわち細胞外の遊離 Ca は $10^{-3} M$ 以上の濃度で存在するのに対し、細胞内 Ca は $10^{-7} M$ あるいはそれ以下に保たれている。そしてこのようなイオンの偏在をもたらすためには、イオンを能動的に運ぶ機構が細胞膜に存在しなくてはならない。Na, K に関しては、Na, K-ATPase が細胞膜に存在し、これが Na, K の偏在を作り出している。Ca の排出機構としては、現在のところ、Ca ポンプ (Ca-ATPase) および Na - Ca 交換機構の2つの機構の存在の可能性が考えられている。

Ca-ATPase 機構は、はじめ筋小胞体でみいだ

され、現在では Na, K-ATPase とともにきわめてくわしく研究されているイオン輸送性の酵素である (4-1-4 参照)。最近いくつかの組織において、この Ca-ATPase が細胞膜にも存在し、Ca を排出しているのではないかと示唆がなされている。これを最初に報告したのは Dunham と Glynn (1961) で、赤血球の細胞膜に ATP 依存性の Ca 取り込み機能が存在することを示した。その後、軟体動物の巨大神経 (Mullins と Brinley, 1975; Baker と McNughton, 1976; Reguena ら, 1977)、脳より調製した細胞膜標本 (Nakamura と Schwartz, 1971; Robinson, 1976) にも同様の機構が存在する可能性が指摘されている。

これとは別に Na-Ca 交換機構が Ca ポンプとして働いているのではないかという可能性が指摘されている。Ca-ATPase が ATP の加水分解により生ずるエネルギーを利用するのに対して、Na-Ca 交換機構は Na ポンプにより作られた Na 濃度勾配を利用する。しかし Na 濃度勾配は、Na, K-ATPase による ATP の加水分解により

生じたエネルギーを利用してゐるので、Na-Ca交換機構は間接的にはATPをエネルギー源として利用してゐる。軟体動物の巨大神経においては、このNa-Ca交換機構がきわめて重要な役割を担つてゐると考えられてゐる(Reguena と Mullins, 1979; Mullins, 1981)。

このように現在のところ細胞膜には、2種類のCaポンプ機構が存在するのではないかという考えがいくつかの細胞において提唱されているが、それでは血管平滑筋におけるCa排出は、生理的にはどのような機構によりなされてゐるのであろうか。

モルモット血管平滑筋にウワバインやK除去液を作用させることによりNa濃度勾配を減少させると収縮が発生したが、外液のNaを減少させることによりNa濃度勾配を減少させてもあまり大きな収縮は発生しなかつた。またNa除去液中でも筋の弛緩が認められた。これらの実験成績はモルモット血管平滑筋細胞膜のCa排出がNa濃度勾配のみに依存してゐない

ことを示している。さらに Na 濃度勾配に対する収縮の感受性には動物種差あるいは部位による差が認められ、たとえばウサギの血管平滑筋においては、Na に対する依存性は低かった。以上のことから血管平滑筋には、少なくとも Na - Ca 交換機構以外の Ca 排出機構が存在していることが示唆される。

最近、平滑筋細胞から、細胞膜を豊富に含む分画を調整する試みがなされるようになり、この分画に Ca-ATPase 活性が認められるという報告がいくつかなされている (Ford と Hess, 1975; Janis ら, 1977; Kutsky と Goodman, 1978)。しかしこの分画には筋小胞体膜などが混在している可能性があり、さらに詳細な検討が必要と思われる。一方、モルモット盲腸紐の組織標本において細胞膜に Caポンプ (Ca-ATPase) が存在する可能性が指摘されているか (van Breemen ら, 1973, 1975; Casteels と Van Breemen, 1975), これも、明確な実験成績に基づいたものではない。

現在の時点では、平滑筋のCa排出機構としては他の組織で考えられているのと同様に、Ca-ATPaseとNa-Ca交換機構の2つが存在すると考えるのが妥当と思われる。しかし生理的にはどちらがより重要なのか、あるいはこれら2つの機構が何らかの機能的な役割分担を行っているのか、といったことは、現在のところ全く不明であるといつてよい。

4-4 平滑筋における強心配糖体の 特異作用

本研究では、心筋において提案されているウワバインの「特異作用」が、平滑筋にも存在し、これが収縮に関与するかどうかについて検討した。その結果、血管平滑筋においてウワバインは、細胞内にNaを増加させることなく、収縮を発生させることが明らかになった。しかもこの作用は、ベラパミルによつて抑制されないことから、脱分極性の収縮ではないことも示された。このような作用は、 $2 \times 10^{-5} M$ という高濃度のウワバインにより発生したものであるが、さらに低濃度のウワバインでも発生するのかが、あるいはウワバインの受容体への結合を抑制するような因子が、この作用に変化を与えるものか、さらに Ca 動態に対する影響などを検討する必要があると考えられる。

Murthyら (1974) は, ウサギ子宮平滑筋において, ウワバインやジゴキシンの取り込みとアセチルコリン収縮の増強効果とが平行しないことを観察し, 変力作用と Na, K-ATPase 抑制は異なる二つの受容器を介して行われているのではないかと考えている。Belardinelliら (1979) は, イヌ冠状動脈において, TEA 存在下で見られる活動電位がウワバインやジゴキシンの増強されることを観察しているが, この成績は心筋の Ca 電流に対する強心配糖体の作用と一致している。

4-5 高血圧の病態生理と Na - Ca 交換機構

血管平滑筋における Na - Ca 交換機構の問題は、高血圧の病態生理と関連づけるという臨床的な立場からも興味をもたれている。以下この点についてふれてみる。

血液中の K 濃度は、各種の条件下で変動するが、低カリウム血症においては血圧の上昇が認められる。また強心配糖体は、治療量の範囲ではむしろ血圧を下降させるが、中毒量では高血圧となる。この強心配糖体の昇圧作用の大部分は、血管平滑筋を支配する交感神経を介する作用といわれているが、一部は血管平滑筋に対する直接作用によると考えられている (Gillis と Quest, 1980)。一方、実験的な低カリウム血症による高血圧は、 α 遮断薬を投与された動物においても観察されるので、平滑筋に対する直接作用による部分が多いと

考えられている (Haddy, 1975)。

近年, 自発性高血圧ラット (SHR) や各種の実験的高血圧動物を用いて高血圧発症の機序を明らかにしようとする研究がさかんに行われているが, そのなかで高血圧動物から抽出された血管平滑筋の Na 代謝が正常のものとは異なるという報告がなされている。例えば, SHR およびデオキシコルチコステロン (DOCA) 処置のラット尾動脈で, 受動的な Na や K の動きが対象と比べて増加し (Friedman と Friedman, 1976; Friedman, 1979), また DOCA 処置のラット大動脈においては, Cl および K の透過性が増加している (Jones と Hart, 1975)。さらに SHR の尾動脈 (Hermsmeyer, 1976b; Webb と Bohr, 1979) および DOCA 処置のラット尾動脈 (Friedman と Nakashima, 1978) における Na ポンプ活性が増加しているとの報告もある。しかし Pamnani ら (1978) は, DOCA 処置ラットの尾動脈における Na ポンプはむしろ抑制されており, また Kuriyama と Suzuki (1978) は, SHR の

門脈および肺動脈におけるNaポンプは正常と変わらないと報告している。

アンギオテンシン変換酵素阻薬である captopril (SQ 14225) は, SHR や実験的高血圧に対して降圧作用を示すことが報告され (Laffan ら, 1978; Bengis ら, 1978; Antonaccio ら, 1979; Koike ら, 1980), 近年臨床に應用されるに至っている。先に述べたように, SHR の血管平滑筋においては, Na透過性が増加しているが, Ito ら (1980, 1981) はこのNa透過性の亢進が captopril の投与により抑制されることを見出した。また SHR から摘出した血管平滑筋の K 除去液に対する収縮性も正常ラット (Wistar Kyoto) の血管と比べ亢進しているが, これも captopril の投与により回復することを観察し, 血圧, 血管平滑筋の収縮性ならびに Na透過性の三者が平行していることを示した。

Na動態はCa動態と密接に関連しており, またごく微量の細胞内Ca濃度の増加で収縮が誘起されるので, わずかなNa透過性の変化でも

血圧は充分に変化する可能性がある。高血圧とNa-Ca交換機構との関連を示す直接的な証拠は未だないが、この考えは、高血圧の機序を説明する興味深い提案といえる。

4-6 まとめ

平滑筋の収縮機構に関する研究は、細胞膜を介するCaの動きを直接測定することが困難であることから、収縮反応を通してCaの動きを推定することが多い。これまで、血管平滑筋における強心配糖体の収縮作用の機序については、Na-Ca交換機構により説明する試みが多くなされてきた。しかし、KarakiとUrakawa (1977) および Bonaccorsiら (1977) によりNa濃度勾配の減少に伴う血管平滑筋収縮が、内因性カテコラミンによるものであることが指摘されて以来、それまで行われていた大部分の研究に再検討の必要が生じた。

本研究は、血管平滑筋に対する強心配糖体の収縮作用を、特にNa-Ca交換機構に関する問題を中心に検討することを目的として行った。実験ではまず、各種の実験動物から抽出した血管に対する収縮作用の観察を行ったが、

その結果, Na濃度勾配の減少に対し血管平滑筋は, 神経原性および筋原性に収縮反応を示すが, おのおのの関与の程度は血管の部位あるいは動物種により複雑に変化することが明らかにされた。筋原性の反応に関しては, モルモット大動脈を対象に収縮, ^{45}Ca 動態およびNa動態について検討したが, Na-Ca交換機構の存在を示唆する成績を得た。そして特にウサギ動脈平滑筋においてはNa濃度勾配の変化に対し反応が弱いことも明らかとなった。また, 強心配糖体の収縮作用には, Naポンプ抑制とは関連しない要素のあることも示唆された。

Na-Ca交換機構は, イカ巨大神経をはじめとする軟体動物の神経組織において詳しく研究されているが, RequenaとMullins(1979)は, 総説の中でNa-Ca交換機構がCa排出の大部分を担っていると推定し, 生理的意義を強調している。心筋においてもReuterおよびSeitz(1968)の報告以来, Na-Ca交換機構の存在すること

が一般的に受入れられており，Ca排出機構として生理的にも重要な役割を担っていることが示唆されている（Mullins, 1981）。また，異論もあるが強心配糖体の収縮力増強作用は，この機構を介して行われているのではないかと考えるもある。本研究により，血管平滑筋にもNa-Ca交換機構が存在することが明らかとなったが，その生理的意義については，十分な知見を得ることはできなかつた。平滑筋細胞は，小さくまた機能も未分化で，研究には多くの困難が伴う。今後，平滑筋収縮機構そのものの解明とともに，Na-Ca交換機構の生理的意義もしだいに明らかになつてゆくと考えられる。

平滑筋におけるNa-Ca交換機構に関する報告は，本研究を行つている間にもいくつかなされた。その中には，Na-Ca交換機構の存在を肯定する報告（Groverら，1981；Hirataら，1981），およびこれを否定する報告（DroogmansとCasteels，1979；AaronsonとvanBreeman 1981, 1982）

が見られる。上記の報告のうち Grover ら (1981) の研究は、子宮筋より調製したマイクロゾーム分画 (細胞膜分画) を用いたものであり、また Hirata ら (1981) は、コラゲネースで単離した平滑筋細胞を用いて研究を行っている。上記の方法にはまだいくつかの問題があり、改良の余地が残されているが、今後平滑筋の研究を行ううえで重要な技術となると思われる。

5 総括

ウワバインやジギタリスで代表される強心配糖体の心筋収縮力増強作用の機序に関する研究は、薬理学の歴史のなかでは重要な命題の一つであり、今日でもなお未解決の問題として残されている。一方、強心配糖体は、種々の平滑筋に対しても作用を示すことが知られているが、とくに血管平滑筋に対する収縮作用については、循環器の一部としての意義から、心臓に対する作用とともに強い関心が持たれている。

強心配糖体は、Naポンプ (Na, K-ATPase) の阻害薬として知られており、種々の組織において、細胞内Na量を増加させることが認められている。一方、各種の組織におけるCa動態に、Naが影響を与えることは古くから観察されているが、近年、神経あるいは心筋組織において、いわゆる「Na-Ca交換機構」の存在が示

唆されている。この機構は、細胞膜を介して Na と Ca を互いに反対方向に交換輸送する機構である。したがって、Na - Ca 交換機構が強心配糖体の心筋収縮力増強作用に関与しているのではないかとの示唆が、多くの研究者によりなされている。他方、平滑筋における強心配糖体の収縮作用にも Na - Ca 交換機構が関与しているのではないかとの論議がある。しかし、これに関しては一部成績に対する誤認などがあつて未解決の問題として残されている。

本研究は、血管平滑筋に対する強心配糖体の収縮作用を、とくに Na - Ca 交換機構に関する問題を中心に検討することを目的とした。実験動物としては、通常、摘出臓器の研究に用いられるウサギ、モルモットおよびラットを用い比較した。強心配糖体としては、水溶性で薬力学的な研究に最も多く用いられるウワバインを用いたが、ウワバインと同様に Na ポンプを強く抑制する K 除去液の作用についても検討を加え、ウワバインの作用と比較した。

5-1 血管平滑筋に対するウワバイン
およびK除去液の収縮作用

ウワバイン ($2 \times 10^{-5} M$) およびK除去液をウサギ大動脈、大腿動脈、腎動脈および耳介動脈に作用させると、立ち上りの早い一過性の収縮が発生した。一部の筋においては、その後ゆつくりとした持続性の収縮が発生した。前半の一過性収縮は、 α -アドレナリン作働性効果遮断薬であるフェントラミン ($10^{-6} M$) により抑制された。モルモット大動脈および大腿動脈においては、ウワバインおよびK除去液により、緩徐な立ち上りの大きな収縮が観察されたが、これらはフェントラミンによりほとんど影響されなかった。ラット大動脈はK除去液で持続性の収縮を発生したが、ウワバインでは、この収縮は観察されなかった。

以上の成績から、血管平滑筋におけるNaポ
ンフ抑制による収縮には、内因性カテコラミ

ソの遊離を介する部分および筋に対する直接作用と考えられる部分のあることが示された。さらに、これらの関与の程度は、動物種および血管の部位により異なることも示された。

5-2 K除去液による収縮と細胞内Na量との関係

ウサギ、モルモットおよびラット大動脈におけるK除去液による収縮と細胞内Na量（「低温Li法」により測定）との関係を、フェントラミン存在下で検討した。モルモットおよびラット大動脈におけるK除去液による収縮は、ウサギ大動脈における収縮と比べて立ち上りが早く、また収縮の程度も大きかった。一方、K除去液は、細胞内Na量を増加させたが、モルモットおよびラット大動脈で2~3時間で最大値に達したのに対し、ウサギ大動脈では8~10時間を要した。経時的に測定された細胞内Na量と収縮の大きさを比較すると、モル

モットおよびラット大動脈において両者がよく相関したのに対し、ウサギ大動脈では相関が低く、十分なNa蓄積後も観察される収縮が小さいことが示された。

以上の成績より、モルモット大動脈におけるウワバインおよびK除去液による収縮には、他の標本と比べ、筋に直接作用して発生したと考えられる部分が大いこと、また細胞内Na量増加とよく相関することなどが明らかとなった。そこで以下の実験においては、モルモット大動脈を用いウワバインおよびK除去液収縮作用の機序についての検討を行った。

5-3 モルモット大動脈におけるウワバインとK除去液による収縮の性格および ^{45}Ca 動態

モルモット大動脈のウワバインおよびK除去液による収縮の大きさは、外液のCa濃度に依存していた。Ca除去液により抑制された収

縮は、Ca再添加により回復したが、Ca再添加の際に $[Ca] / [Na]_0^2$ の比が一定となるように外液のNa濃度を減少させると、外液のCa濃度にかかわらず一定の大きさの収縮が得られた。すなわち面収縮は、外液のCa濃度だけでなくNa濃度にも依存することが示された。一方、高濃度K液による収縮は、ウワバインおよびK除去液による収縮と同様に外液のCa濃度に依存していたが、Na濃度には無関係であった。

ウワバインおよびK除去液による収縮は、Caチャネルの特異的阻害薬として知られるベラパミル ($10^{-6} M$) によりほとんど影響されなかった。一方、ベラパミルは、高濃度K収縮を強く抑制した。

K除去液中における ^{45}Ca 取り込みを低温La法により測定すると、Na蓄積時にその増加が認められた。ベラパミルは、この ^{45}Ca 取り込みに影響しなかった。一方、高濃度K液は、 ^{45}Ca 取り込みを増加させたが、これは、ベラ

パミルにより抑制された。

以上の成績から、モルモット大動脈におけるウワバインおよびK除去液による収縮は、Naイオンの動態と密接に関係すること、そしてこれらの収縮は、高濃度K液による収縮とは性格を異にすることが明らかとなった。すなわち血管平滑筋にNa-Ca交換機構の存在する可能性が示唆された。

5-4 血管平滑筋に対するNa除去液の収縮作用

細胞内Na量を増加させずにNa濃度勾配を減少させるため、Na除去液を用いてその作用を検討した。Na除去液(Li置換)は、ラット大動脈を収縮させたが、ウサギおよびモルモット大動脈の張力には影響しなかった。しかしウサギおよびモルモット大動脈においては、ウワバインあるいはK除去液で適当時間処理して細胞内Na量を増加させた後、Na除去液を

作用させると収縮が発生した。これらの収縮は、外液 Ca の除去により消失したが、ベラパミルは、無影響であつた。ウワバインで前処置したモルモット大動脈の Na 除去液中における ^{45}Ca の取り込み量は、無処置の筋に比べ増加していた。この増加もベラパミルにより影響されなかつた。一方、細胞内 Na 量の Na 除去液中での減少は、外液 Ca (2.5 mM) の添加により約 2 倍に促進された。

以上、Na 除去液を用いて得られた成績は、血管平滑筋に Na-Ca 交換機構の存在することをさらに支持するものと考えられる。

5-5 モルモット大動脈におけるウワバインおよび K 除去液による収縮作用の比較

これまで提案された強心配糖体による強心作用の機序の中で、収縮の増強と Na ポンプ抑制とはかならずしも関連せず、Ca 動態に直接

影響して作用を発現するのではないかとこの仮説がある。このような強心配糖体の作用が、平滑筋においてみられるかどうかを、ウワバインとK除去液の作用を比較することにより検討した。

K除去液は、細胞内にNaが蓄積しない条件下、すなわち外液のNaを除去した場合には、収縮を発生させなかつた。一方、ウワバインは、Na除去液中においても小さな収縮を発生させた。ウワバインおよびK除去液による収縮の大きさと細胞内Na量との関係を調べると、ウワバインは、K除去液と比べ同量のNa量でより大きな収縮を発生させた。このようなウワバインの収縮作用は、ベラパミル存在下でも同様に観察された。

以上の成績から、ウワバインの収縮作用の一部には、K除去液と異なりNa蓄積と関連しない要因のあることが示された。

以上を要約すると，血管平滑筋は，強心配糖体およびK除去液により収縮するが，この収縮は，内因性カテコラミンの遊離を介する部分と，筋に直接に作用したと考えられる部分とに分けられた。両成分の関与の割合は，動物種あるいは血管の部位によつて異なり，ウサギの血管においては神経性の要素が多く，モルモットおよびラットの血管には筋原性の要素の多い傾向が認められた。モルモット大動脈における収縮を詳しく検討したところ，この収縮が細胞内Naの蓄積と対応し，また， $[Ca]_o / [Na]_o^2$ の比に従うなどの成績が得られた。さらにNa除去液の収縮作用あるいはNa動態に対するCaの作用などの成績から，血管平滑筋にも他のいくつかの組織におけると同様，Na-Ca交換機構が存在することが示唆され，この機構が強心配糖体の収縮に関与することが示された。さらにK除去液による収縮との比較から，強心配糖体にはNaポンプ抑制を介さない収縮作用があることも示唆された。

他方、生体において、強心配糖体の過剰投与あるいは低カリウム血症は、血圧を上昇させることが知られている。この一部は、神経性の要因が関与するといわれ、また一部は、血管平滑筋に対する直接作用により発現すると考えられている。摘出血管平滑筋を用いて得られた上記の知見は、生体で得られたこれらの現象の説明に役立つものと思われる。

- Aaronson, P., van Breemen, C. and Zera, P.** (1980) Kinetics of high K depolarization-mediated calcium uptake into guinea-pig taenia coli. *Fed. Proc.* 39, 710.
- Aaronson, P., and van Breemen, C.** (1981) Effects of sodium gradient manipulation upon cellular calcium, ^{45}Ca fluxes and cellular sodium in the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 319, 443-461.
- Aaronson, P. and van Breemen, C.** (1982) Effects of Na readmission on cellular ^{45}Ca fluxes in Na-depleted guinea-pig taenia coli. *J. Mem. Biol.* 65, 89-98.
- Akera, T., Larsen F.S. and Brody, T.M.** (1969) The effect of ouabain on sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase from the hearts of several mamalian species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 170, 17-26.
- Akera, T., Larsen, F.S. and Brody, T.M.** (1970) Correlation of cardiac sodium-potassium-activated adenosinetriphosphatase activity with ouabain-induced inotropic stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 173, 145-151.
- Akera, T. and Brody, T.M.** (1976) Inotropic action of digitalis and ion transport. *Life Sci.* 18, 135-142.
- Akera, T., Bennet, R.T., Olgaard, M.K. and Brody, T.M.** (1976) Cardiac Na,K-adenosinetriphosphatase inhibition by ouabain and myocardial sodium: a computer simulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199, 287-297.
- Akera, T.** (1977) Membrane adenosinetriphosphatase: a digitalis receptor. *Science* 198, 569-574.
- Akera, T. and Brody, T.M.** (1978) The role of Na,K-ATPase in the inotropic action of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 29, 187-220.
- Allen, J.C. and Schwartz, A.** (1969) A possible biochemical explanation for the insensitivity of the rat to cardiac glycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 168, 42-46.

- Altura, B.M. and Altura, B.T.** (1974) Magnesium and contraction of arterial smooth muscle. *Microvasc. Res.* 7, 145-155.
- Altura, B.M. and Altura, B.T.** (1981) General anesthetic and magnesium ions as Ca antagonists on vascular smooth muscle. In *New Perspectives on Calcium Antagonists*, Weiss, G.B., editor, American Physiological Society, Maryland, 131-145.
- Antonaccio, M.J., Rubin, B., Horowitz, Z.P., Laffan, R.J., Goldberg, M.E., High, J.P., Harris, D.N. and Zaidi, I.** (1979) Effect of chronic treatment with captopril (SQ 14225), an orally active inhibitor of angiotensin converting enzyme, in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 29, 285-294.
- Baker, P.F. and Blaustein, M.P.** (1968) Sodium-dependent uptake of calcium by crab nerve. *Biochim. Biophys. Acta.* 150, 167-170.
- Baker, P.F., Blaustein, M.P., Hodgkin, A.L. and Steinhardt, R.A.** (1969) The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J. Physiol.* 200, 431-458.
- Baker, P.F.** (1972) Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 24, 177-223.
- Baker, P.F. and McNaughton, P.A.** (1976) Kinetics and energetics of calcium efflux from intact squid giant axons. *J. Physiol.* 259, 103-144.
- Baker, P.F.** (1978) The regulation of intracellular Ca in squid giant axon. In *Calcium Transport and Cell Function*, Scarpa, A. and Carafoli, E., editors, The New York Academy Science, New York, 250-268.
- Banks, P.** (1967) The effect of ouabain on the secretion of catecholamines and on the intracellular concentration of potassium. *J. Physiol.* 193, 631-637.
- Belardinelli, L., Harder, D., Sperelakis, N., Rubio, R. and Berne, R.M.** (1979) Cardiac glycoside stimulation of inward current in vascular smooth muscle of canine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209, 62-66.

- Bengis, R.G., Coleman, T.G., Young, D.B. and McCaa, R.A.** (1978) Long-term blockade of angiotensin formation in various normotensive and hypertensive rat models using converting enzyme inhibitor (SQ 14225). *Circ. Res.* 43, Supp. I, 145-153.
- Bentfeld, M., Lüllmann, H., Peters, T. and Proppe, D.** (1977) Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle. *Br. J. Pharmacol.* 61, 19-27.
- Bers, D.M., Philipson, K.D. and Nishimoto, A.Y.** (1980) Sodium-calcium exchange and sidedness of isolated cardiac sarcolemmal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* 601, 358-371.
- Besch, H.R., Allen, J.C., Glick, G. and Schwartz, A.** (1970) Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme systems from canine myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 171, 1-12.
- Bevan, J.A. and Verity, M.A.** (1976) Sympathetic nerve free muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 157, 117-124.
- Blaustein, M.P. and Hodgkin, A.L.** (1969) The effect of cyanide on the efflux of calcium from squid axons. *J. Physiol.* 200, 497-527.
- Blaustein, M.P.** (1974) The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 70, 33-82.
- Blaustein, M.P.** (1976) The ins and outs of calcium transport in squid axons: internal and external ion activation of calcium efflux. *Fed. Proc.* 35, 2574-2578.
- Blaustein, M.P.** (1977a) Effects of internal and external cations and of ATP on sodium-calcium and calcium-calcium exchange in squid axons. *Biophys. J.* 20, 79-111.
- Blaustein, M.P.** (1977b) Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: reassessment and a hypothesis. *Am. J. Physiol.* 232, C165-C173.

- Bohr, D.F., Seidel, C. and Sobheski, J.** (1969) Possible role of sodium-calcium pumps in tension development of vascular smooth muscle. *Microvas. Res.* 1, 335-343.
- Bolton, T.B.** (1979a) Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718.
- Bolton, T.B.** (1979b) Cholinergic mechanism in smooth muscle. *Br. Medical Bulletin.* 35, 275-283.
- Bonaccorsi, A., Hermsmeyer, K., Smith, C.B. and Bohr, D.F.** (1977) Norepinephrine release in isolated arteries induced by K free solution. *Am. J. Physiol.* 232, H140-H145.
- Bose, D.** (1975) Mechanism of mechanical inhibition of smooth muscle by ouabain. *Br. J. Pharmacol.* 55, 111-116.
- Brading, A.F. and Widdicombe, J.F.** (1975) Interaction between sodium and calcium movements in smooth muscle. In *Smooth Muscle Pharmacology and Physiology*, Worcel, M. and Vassort, G., editors, INSERM, Paris, 235-245.
- Brading, A.F.** (1978) Calcium-induced increase in membrane permeability in the guinea-pig taenia coli: evidence for involvement of a sodium-calcium exchange mechanism. *J. Physiol.* 275, 65-84.
- Brender, D., Vanhoutte, P.M. and Shepherd, J.T.** (1969) Potentiation of adrenergic venomotor responses in dog by cardiac glycosides. *Circ. Res.* 25, 597-606.
- Brender, D., Cameron, G.S. and Shepherd, J.T.** (1970) Effects of acetylstrophanthidin on isolated veins of the dog. *Circ. Res.* 26, 647-655.
- Briggs, A.H.** (1962) Calcium movements during potassium contracture in isolated rabbit aortic strips. *Am. J. Physiol.* 203, 849-852.

- Briggs, A.H. and Shibata, S.** (1966) Ca and ouabain interaction on vascular smooth muscle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 274-278.
- Brinley, F.J.** (1976) Calcium and magnesium metabolism in cephalopod axon. *Fed. Proc.* 35, 2572-2595.
- Brinley, F.J.** (1978) Calcium buffering in squid axons. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7, 363-392.
- Broekaert, A. and Godfraind, T.** (1973) The action of ouabain on isolated arteries. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 203, 393-395.
- Burton, J. and Godfraind, T.** (1974) Sodium-calcium sites in smooth muscle and their accessibility to lanthanum. *J. Physiol.* 241, 287-298.
- Carrier, G.O., Lüllmann, H., Naubauer, L. and Peters, T.** (1974) The significance of a fast exchanging superficial calcium fraction for the regulation of contractile force in heart muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6, 333-347.
- Casteels, R.** (1966) The action of ouabain on the smooth muscle cells of the guinea-pig's taenia coli. *J. Physiol.* 184, 131-142.
- Casteels, R.** (1970) The relation between the membrane potential and ion distribution in smooth muscle. In *Smooth Muscle*, Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T., editors, Edward Arnold, London, 70-99.
- Casteels, R. and van Breemen, C.** (1975) Active and passive Ca^{2+} fluxes across cell membranes of the guinea-pig taenia coli. *Pflüger's Arch.* 359, 197-207.
- Casteels, R. and Raeymaekers, L.** (1977) Electrolytes and vascular reactivity. In *Factors Influencing Vascular Reactivity*, Carrier, O. and Shibata, S., editors, Igaku-shoin, Tokyo, 57-73.
- Casteels, R.** (1981) Membrane potential in smooth muscle cell. In *Smooth Muscle*, Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T., editors, Edward Arnold, London, 105-126.

Cattell, M. and Gold, H. (1938) Influence of digitalis glycosides on force of contraction of mammalian cardiac muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 62, 116-125.

Chapman, R.A. (1979) Excitation contraction coupling in cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 35, 1-52.

Cohen, I., Daut, J. and Noble, D. (1976) An analysis of the action of low concentration of ouabain on membrane currents in Purkinje fibres. *J. Physiol.* 260, 75-103.

Coraboef, E., Gautier, P. and Guirandou, P. (1981) Potential and tension changes induced by sodium removal in dog Purkinje fibres: role of an electrogenic sodium-calcium exchange. *J. Physiol.* 311, 605-622.

Crankshaw, D.J., Janis R.A. and Daniel, E.E. (1977) The effect of Ca antagonists on Ca accumulation by subcellular fractions of rat myometrium. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 1028-1032.

Crompton, M., Moser, R., Ludi, H. and Carafoli, E. (1978) The interrelations between the transport of sodium and calcium in mitochondria of various mammalian tissues. *Eur. J. Biochem.* 82, 25-31.

Daniel, E.E., Sehdev, H. and Robinson, K. (1962) Mechanism of activation of smooth muscle. *Physiol. Rev. suppl.* 5, 228-260.

Daniel, E.E. (1964) Interconnection between active transport and contracture in uterine tissue. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 42, 453-495.

Daniel, E.E. and Massingham, R. (1970) The mechanism of contractile effects of ouabain and zinc on the rat uterus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 173, 293-306.

Deitmer, J.W. and Ellis, D. (1978) Changes in the intracellular sodium activity of sheep Purkinje fibres produced by calcium and other divalent cations. *J. Physiol.* 277, 437-453.

Deth, R.C. (1978) Effect of lanthanum and reduced temperature on ^{45}Ca efflux from rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* 243, C139-C145.

Dramane, K., Driot, P. and Garnier, D. (1971) Action de la ouabaine sur les courants transmembranaires du myocarde sinoauriculaire de grenouille. *J. Physiol. (Paris)* 63, 43A.

Drasfeld, H., Greef, K., Schorn, A. and Ting, B.T. (1969) Calcium uptake in mitochondria and vesicles of heart and skeletal muscle in presence of potassium, sodium, k-strophanthin and pentobarbital. *Biochem. Pharmacol.* 18, 1335-1345.

Droogmans, G. and Casteels, R. (1979) Sodium and calcium interaction in vascular smooth muscle cells of rabbit ear artery. *J. Gen. Physiol.* 74, 57-70.

Duggan, D.E. and Noll, R.M. (1965) Effects of ethacrynic acid and cardiac glycosides upon a membrane adenosin triphosphatase of renal cortex. *Arch. Biochem. Biophys.* 109, 388-396.

Dunham, E.T. and Glynn, I.M. (1961) Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *J. Physiol.* 156, 274-293.

Ebashi, S., Endo, M. and Ohtsuki, I. (1969) Control of muscle contraction. *Quart. Rev. Biophys.* 2, 351-384.

Ebashi, S. (1976) Excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 293-311.

江橋節郎 (1976) 筋収縮の分子的機構.
生体の科学 27, 57-67.

Ellis, D. (1977) The effects of external cations and ouabain on the intracellular sodium activity of sheep herat Purkinje fibres. *J. Physiol.* 273, 211-240.

- Endo, M., Kitazawa, T., Yagi, S., Iino, M. and Kakuta, Y.** (1977) Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers. In *Excitation-contraction Coupling in Smooth Muscle*, Casteels, R., Godfraind, T. and Ruegg, J.C., editors, Elsevier, North-Holland, 199-209.
- Esquerro, E., Garcia, A.Q., Hernandez, M., Kirperkar, S.M. and Prat, J.C.** (1980) Catecholamine secretory response to calcium reintroduction in the perfused cat adrenal gland treated with ouabain. *Biochem. Pharmacol.* 29, 2669-2436.
- Fabiato, A. and Fabiato, F.** (1979) Calcium and cardiac excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 473-484.
- Filo, R.S., Bohr, D.F. and Rüegg, J.C.** (1972) Glycerinated skeletal and smooth muscle: calcium and magnesium dependence. *Science* 147, 1581-1583.
- Fiskum, G. and Lehninger, A.L.** (1980) The mechanism and regulation of mitochondrial Ca transport. *Fed. Proc.* 39, 2432-2436.
- Fleckenstein, A.** (1964) Die Bedeutung der energiereichen Phosphate für Kontraktilität und Tonus des Myokards. *Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med.* 70, 81-99.
- Fleckenstein, A.** (1977) Specific pharmacology of calcium in myocardium, cardiac pacemakers, and vascular smooth muscle. *Ann. Rev. Physiol.* 17, 149-166.
- Fleckenstein, A.** (1981) Fundamental actions of calcium antagonists on myocardial and cardiac pacemaker cell membrane. In *New Perspectives of Organic Calcium Antagonist*, Weiss, G.B., editor, American Physiological Society, Maryland, 59-81.
- Fleming, W.W.** (1980) The electrogenic Na, K-pump in smooth muscle: physiologic and pharmacologic significance. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 129-149.

Ford, G.D. and Hess, M.L. (1975) Calcium-accumulating properties of subcellular fractions of bovine vascular smooth muscle. *Circ. Res.* 37, 580-587.

Friedman, S.M., Nakashima, M., Palaty, V. and Walters, B.K. (1972) Vascular resistance and Na-K gradients in the perfused rat tail artery. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 51, 410-417.

Friedman, S.M. (1974) Lithium substitution on the distribution of sodium in the rat tail artery. *Circ. Res.* 34, 168-175.

Friedman, S.M. and Friedman, C.L. (1976) Cell permeability, sodium transport, and the hypertensive process in the rat. *Circ. Res.* 39, 433-441.

Friedman, S.M. and Nakashima, M. (1978) Evidence for enhanced Na transport in hypertension induced by DOCA in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56, 1029-1035.

Friedman, S.M. (1979) Evidence for enhanced sodium transport in the tail artery of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1, 572-582.

Furchgott, R.F. (1960) Spiral-cut strips of rabbit aorta for in vitro studies of responses of arterial smooth muscle. *Methods Med. Res.* 8, 177-186.

Gabella, G (1981) Structure of smooth muscle. In *Smooth Muscle*, Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T., editors, Edward Arnold, London, 1-46.

Gadsby, D.C., Niedergerke, R. and Page, S. (1980) Do intracellular concentration of potassium or sodium regulate the strength of the heart beat. *Nature*, 233, 651-652.

Garcia, A.G. and Kirpekar, S.M. (1973a) Release of noradrenaline from the cat spleen by sodium deprivation. *Br. J. Pharmacol.* 47, 729-747.

Garcia, A.G. and Kirpekar, S.M. (1973b) Release of noradrenaline from slices of cat spleen by pretreatment with calcium, strontium and barium. *J. Physiol.* 235, 693-713.

Garcia, A.G., Hernandez, M., Horga, J.F. and Sanchez-Garcia, P. (1980) On the release of catecholamines and dopamine- β -hydroxylase evoked by ouabain in the perfused cat adrenal gland. *Eur. J. Pharmacol.* 68, 571-583.

Garcia, A.G., Garcia-Lepez, E., Montiel, C., Nicolal, G.P. and Sanchez-Garcia, P. (1981) Correlation between catecholamine release and sodium pump inhibition in the perfused adrenal gland of the cat. *Br. J. Pharmacol.* 74, 665-672.

Garfield, R.E. and Somlyo, A.P. (1977) Ultrastructural basis for vascular smooth muscle reactivity. In *Factors Influencing Vascular Reactivity*, Carrier, O. and Shibata, S., editors, Igaku-Shoin, Tokyo, 1-25.

Gervais, A., Lane, L.K., Auner, B.M., Lindenmayer, E. and Schwartz, A. (1977) A possible molecular mechanism of the action of digitalis. *Circ. Res.* 40, 8-14.

Gillis, R.A. and Quest, J.A. (1980) The role of the nervous system in the cardiovascular effects of digitalis. *Pharmacol. Rev.* 31, 19-97.

Glitsch, H.G., Reuter, H. and Scholz, H. (1970) The effect of the internal sodium concentration on calcium fluxes in isolated guinea-pig auricles. *J. Physiol.* 209, 25-43.

Glynn, I.M. (1963) Transport of adenosinetriphosphatase in electric organ: the relation between ion transport and oxidative phosphorylation. *J. Physiol.* 169, 452-465.

Godfraind, T. and Godfraind-de Becker, A. (1963) Action des glycosides cardiotoniques sur le muscle lisse. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 144, 226-240.

Godfraind, T. (1976) Calcium exchange in vascular smooth muscle, action of noradrenaline and lanthanum. *J. Physiol.* 260, 21-35.

- Godfraind, T. and Ghysel-Burton, J.** (1977) Biding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of sodium pump. *Nature* 265, 165-166.
- Godfraind, T. and Ghysel-Burton, J.** (1979) Stimulation and inhibition of the sodium pump by cardiac steroids in relation to their biding sites and their inotropic effect on guinea-pig atria. *Br. J. Pharmacol.* 66, 175-184.
- Godfraind, T.** (1981) Calcium influx and receptor-response coupling. In *New Perspectives on Calcium Antagonists*, Weiss, G.B., editor, American Physiological Society, Bethesda, 95-107.
- Gold, H. and Cattele, M.** (1940) Mechanism of digitalis action in abolishing heart failure. *Arch. Int. Med.* 65, 263-278.
- Golenhofen, K. and Hermstein, N.** (1975) Differentiation of calcium activation mechanism in vascular smooth muscle by selective suppression with verapamil and D600. *Blood Vessels* 12, 21-31.
- Goodford, P.J. and Leach, E.H.** (1966) The extracellular space of the smooth muscle of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 186, 1-10.
- Grover, A.K., Kwan, C.Y. and Daniel, E.E.** (1981) Na-Ca exchange in rat myometrium membrane vesicles highly enriched in plasma membrane. *Am. J. Physiol.* 240, C175-C182.
- Haddy, F.J.** (1975) Potassium and blood vessels. *Life Sci.* 16, 1489-1498.
- Haeusler, G., Richards, J.G. and Thorens, S.** (1981) Noradrenaline contraction in rabbit mesenteric arteries skinned with saponin. *J. Physiol.* 321, 537-556.
- Haustein, K.O., and Hauptmann, J.** (1974) Studies on cardioactive steroids. II. Structure-activity relationships in the isolated guinea-pig heart. *Pharmacol.* 11, 129-138.

- Hendrickx, H. and Casteels, R.** (1974) Electrogenic sodium pump in arterial smooth muscle cell. *Pflüger's Arch.* 346, 299-306.
- Hermesmeyer, K.** (1976a) Ba and K alteration of K conductance in spontaneously active vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 230, 1031-1036.
- Hermesmeyer, K.** (1976b) Electrogenesis of increased norepinephrine sensitivity of arterial vascular smooth muscle in hypertension. *Circ. Res.* 38, 362-367.
- Hess, M.L. and Ford, G.D.** (1974) Calcium accumulation by subcellular fractions from vascular smooth muscle. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6, 275-282.
- Hester, R.K., Weiss, G.B. and Fry, W.J.** (1979) Differing effect of nitroprusside and D600 on tension and ^{45}Ca fluxes in canine renal arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208, 155-160.
- Hirata, M., Itoh, T. and Kuriyama, H.** (1981) Effects of external cations on calcium efflux from single cells of the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 310, 321-336.
- Honerjäger, P. and Reiter, M.** (1977) Sarcolemmal sodium permeability and contractile force of guinea-pig papillary muscle. *Circ. Res.* 40, 90-98.
- Horackova, M. and Vassort, G.** (1979) Sodium-calcium exchange in regulation of cardiac contractility. *J. Gen. Physiol.* 73, 403-424.
- Hudgins, P.M.** (1969) Some drug effects on calcium movements in aortic strips. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 170, 303-310.
- Ito, K., Karaki, H. and Urakawa, N.** (1977) The mode of contractile action of palytoxin on vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* 46, 9-14.
- Ito, K., Koike, H., Miyamoto, M. and Urakawa, N.** (1980) Long-term blockade of angiotensin converting enzyme alters passive ion transport of vascular smooth muscle. *Life Sci.* 26, 1023-1027.

Ito, K., Koike, H., Miyamoto, M., Ozaki, H., Kishimoto, T. and Urakawa, N. (1981) Long-term effects of captopril on passive sodium permeability in vascular smooth muscle of spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219, 520-525.

Ito, T., Kuriyama, H. and Suzuki, M. (1981) Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J. Physiol.* 321, 513-535.

James, M.R. and Roufogalis, B.D. (1977a) The effect of ouabain on the guinea-pig ileum longitudinal smooth muscle: 1. ATPase activities on a sarcolemma-enriched fraction prepared with the aid of divalent cation depletion of the intact muscle. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 1190-1196.

James, M.R. and Roufogalis, B.D. (1977b) The effect of ouabain on the guinea-pig ileum longitudinal smooth muscle: 2. Intracellular levels of Ca, Na, K and Mg during the ouabain response and dependence of the response on extracellular Ca. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55, 1197-1203.

Janis, R.A., Crankshaw, D.J. and Daniel, E.E. (1977) Control of intracellular Ca activity in rat myometrium. *Am. J. Physiol.* 232, C50-C58.

Jones, A.W. and Hart, R.G. (1975) Altered ion transport in aortic smooth muscle during deoxycorticosteron acetate hypertension in the rat. *Circ. Res.* 37, 333-341.

Jones, A.W. (1980) Content and fluxes of electrolytes. In *Handbook of Physiology - The Cardiovascular System*, Bohr, D.F., Somlyo, A.P. and Sparks, H., editors, American Physiological Society, Bethesda, 253-299.

Kabell, G., Saini, R.K., Somani, P. and Pressman, B.C. (1979) Effects of the carboxylic ionophore monensin on regional blood flow in normal and ischemic myocardium in anesthetized dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211, 231-237.

- Karaki, H., Ikeda, M. and Urakawa, N.** (1969) Movements of calcium during tension development induced by barium and high-potassium in guinea-pig taenia coli. *Jpn. J. Pharmacol.* 19, 291-299.
- Karaki, H. and Urakawa, N.** (1977) Possible role of endogenous catecholamines in the contractions induced in rabbit aorta by ouabain, sodium depletion and potassium depletion. *Eur. J. Pharmacol.* 43, 65-72.
- Karaki, H., Ozaki, H. and Urakawa, N.** (1978) Effects of ouabain and potassium free solution on the contraction of isolated blood vessels. *Eur. J. Pharmacol.* 48, 439-443.
- Karaki, H. and Weiss, G.B.** (1979) Alteration in high and low affinity binding of ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum and low temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211, 86-92.
- Karaki, H., Hester, R.K. and Weiss, G.B.** (1980) Cellular basis of nitroprusside-induced relaxation of graded response to norepinephrine and potassium. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 245, 198-210.
- Karaki, H., Suzuki, T. and Urakawa, N.** (1981a) Artificial buffers do not inhibit contractile responses in the smooth muscle of rat portal vein and guinea-pig taenia coli. *Jap. J. Pharmacol.* 31, 979-983.
- Karaki, H., Suzuki, T. and Urakawa, N.** (1981b) Tris does not inhibit isolated vascular or intestinal smooth muscle contraction. *Am. J. Physiol.* 241, H337-H341.
- Karaki, H. and Weiss, G.B.** (1981c) Inhibitors of mitochondrial Ca uptake dissociates potassium-induced tension responses from increased ^{45}Ca retention in rabbit aortic smooth muscle. *Blood Vessels* 18, 28-35.
- Karaki, H., Suzuki, T., Ozaki, H. and Urakawa, N.** (1982) Dissociation of K-induced tension and cellular Ca retention in vascular and intestinal smooth muscle in normoxia and hypoxia. *Pflüger's Arch.* (in press).

唐木英明, 那須哲之 と 浦川紀元 (1972) 平滑筋の薬物による収縮とCa動態の変化. 日薬理誌 68, 129-141.

唐木英明 (1981) 血管平滑筋におけるカルシウム分画.
日薬理誌 77, 1-8.

Katase, T. and Tomita, T. (1972) Influences of sodium and calcium on the recovery process from potassium contracture in the guinea-pig taenia coli. *J. Physiol.* 224, 489-500.

Katsuragi, T. and Ozawa, H. (1978) Ouabain-induced potentiation of Ca contraction in the depolarized vas deferens of guinea-pig. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 231, 243-248.

Katsuragi, T., Fukushi, Y. and Suzuki, T. (1978) Neuronal norepinephrine as mediator for ouabain-induced smooth muscle contraction. *Eur. J. Pharmacol.* 47, 407-413.

Katz, A.M. (1972) Increase Ca entry during the plateau of the action potential: a possible mechanism of cardiac glycoside action. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 4, 87-89.

Kidwai, A.M. (1977) Smooth muscle sarcolemmal biochemistry. In *The Biochemistry of Smooth Muscle*, Stephens, N.L., editor, University Park Press, Baltimore, 585-594.

Kishimoto, T., Ozaki, H. and Urakawa, N. (1980) A quantitative relationship between cellular Na accumulation and relaxation produced by ouabain in the depolarized smooth muscle of guinea-pig taenia coli. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 312, 199-207.

Koike, H., Ito, K., Miyamoto, M. and Nishino, H. (1980) Effect of long-term blockade of angiotensin converting enzyme with captopril (SQ 14225) on hemodynamics and circulating blood volume in SHR. *Hypertension* 2, 299-303.

- Korenbrot, J.I.** (1977) Ion transport in membrane. *Ann. Rev. Physiol.* 319, 19-49.
- Kreye, V.A.M., Baron, G.D., Luth, J.B. and Schmidt-Gayk, H.** (1975) More action of sodium nitroprusside on vascular smooth muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 288, 381-402.
- Kroeger, E.A. and Stephens, N.L.** (1975) Effect of tetraethylammonium on tonic airway smooth muscle: initiation of phasic electrical activity. *Am. J. Physiol.* 228, 633-636.
- Ku, D., Akera, T., Tobin, T. and Brody, T.M.** (1974) Effects of rubidium on cardiac tissue: inhibition of Na,K-ATPase and stimulation of cardiac contractile force. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 9, 431-440.
- Ku, D., Akera, T., Frank, M., Brody, T.M. and Isawa, J.** (1977) The effects of grayanotoxin I and alpha-dihydrograyanotoxin II on guinea-pig myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 200, 363-372.
- Kuriyama, H. and Suzuki, H.** (1978) Electrical property and chemical sensitivity of vascular smooth muscles in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Physiol.* 285, 409-424.
- Kutsky, P. and Goodman, F.R.** (1978) Calcium incorporation by canine aortic smooth muscle microsomes. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 231, 4-20.
- Laffan, R.J., Goldberg, M.E., High, J.P., Schaffer, T.R., Waugh, M.H. and Rubin, B.** (1978) Antihypertensive activity in rats of SQ 14225, an orally active inhibitor of angiotensin I converting enzyme. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204, 281-288.
- Langer, G.A.** (1973) Heart: excitation-contraction coupling. *Ann. Rev. Physiol.* 35, 55-86.

- Langer, G.A.** (1980) The role of calcium in the control of myocardial activity: an update. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12, 231-239.
- Langer, G.A.** (1982) Sodium-calcium exchange in the heart. *Ann. Rev. Physiol.* 44, 435-449.
- Lee, C.O., Kang, D.H., Sokol, J.H. and Lee, K.S.** (1980) Relation between intracellular Na ion activity and tension of sheep cardiac Purkinje fibers exposed to dihydro-ouabain. *Biophys. J.* 29, 315-330.
- Lee, K.S. and Klaus, W.** (1971) The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol. Rev.* 23, 193-216.
- Leonard, E.** (1957) Alteration of contractile response of artery strips by a potassium-free solution, cardiac glycosides and changes in stimulation frequency. *Am. J. Physiol.* 189, 185-190.
- Lindenmayer, G. and Schwartz, A.** (1975) A kinetic characterization of calcium on (Na + K)-ATPase and its potential role as a link between extracellular and intracellular events: hypothesis for digitalis-induced inotropism. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 7, 591-612.
- Lindmar, R. and Löffelholz, K.** (1974) The neuronal efflux of noradrenaline: dependency on sodium and facilitation by ouabain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 284, 93-100.
- Lüllmann, H. and Peters, T.** (1974) Cardiac glycosides and contractility. *Adv. Cardiol.* 12, 174-182.
- Lüllmann, H., Peters, T., Preuner, J. and Ruther, T.** (1975) Influence of ouabain and dihydroouabain on the circular dichroism of cardiac plasmalemmal microsomes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 290, 1-19.
- Lüllmann, H. and Peters, J.** (1979) Action of cardiac glycosides on the excitation-contraction coupling in heart muscle. *Prog. Pharmacol.* 2, 1-57.

Lüttgau, H. and Niedgerke, R. (1958) The antagonism between Ca and Na ions on the frog's heart. *J. Physiol.* 143, 486-505.

Ma, T.S. and Bose, D. (1977) Sodium in smooth muscle relaxation. *Am. J. Physiol.* 232, C59-C66.

Maling, M.H., Flesch, J.H. and Saul, W.F. (1971) Species differences in aortic responses to vasoactive amines: the effect of compound 48/80, cocaine, reserpine and 6-hydroxydopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 176, 672-683.

Marban, E. and Tsien, R.W. (1979) Ouabain increases the slow inward calcium current in ventricular muscle. *J. Physiol.* 292, 72p-73p.

Matlib, M.A., Crankshaw, J., Garfield, R.E., Crankshaw, D.A., Kwan, C.Y., Branda, L.A. and Daniel, E.E. (1979) Characterization of membrane fractions and isolation of purified plasma membrane from rat myometrium. *J. Biol. Chem.* 254, 1834-1839.

Matthews, E.K. and Sutter, M.C. (1967) Ouabain-induced changes in the contractile and electrical activity, potassium content, and response to drugs, of smooth muscle cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45, 509-520.

Maxwell, R.A., Eckhardt, S.B. and Wastila, W.B. (1968) Concerning the distribution of endogenous norepinephrine in the adventitial and media-intimal layers of the rabbit aorta and the capacity of these layers to bind tritiated norepinephrine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 161, 34-39.

McCans, J.L., Lindenmayer, G.E., Munson, R.G., Evans, R.W. and Schwartz, A. (1974) A dissociation of positive staircase (Bowditch) from ouabain-induced positive inotropism. *Circ. Res.* 35, 439-447.

Morad, M. and Greenspan, A.M. (1973) Excitation-contraction coupling as a possible site for digitalis on heart muscle. In *Cardiac Arrhythmias*, Dreifus, L.S. and Likoff, W., editors, Grune & Stratton, New York, 479-489.

Mordes, J.P. and Wacker, W.E.C. (1978) Excess magnesium. *Pharmacol. Rev.* 29, 273-300.

Mullins, L.J. and Brinley, F.J. (1975) Sensitivity of calcium efflux from squid axons to changes in membrane potential. *J. Gen. Physiol.* 65, 135-152.

Mullins, L.J. (1981) *Ion Transport in Heart*. Raben Press, New York.

Murthy, R.V. (1974) Dissociation of contractile effect and binding and inhibition of Na-K-adenosine triphosphatase by cardiac glycosides in rabbit myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 188, 575-581.

Nakamura, Y. and Schwartz, A. (1971) Adenosine triphosphate dependent calcium binding vesicles; magnesium, calcium adenosine triphosphatase and sodium potassium adenosine triphosphatase: distributions in dog brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 16-29.

Nakazato, Y., Ohga, A. and Onoda, Y. (1978) The effect of ouabain on noradrenaline output from peripheral adrenergic neurons of isolated guinea-pig vas deferens. *J. Physiol.* 278, 45-54.

Nakazato, Y., Ito, S. and Ohga, A. (1980) Noradrenaline output induced by calcium, strontium and barium during exposure of guinea-pig vas deferens to ouabain. *Eur. J. Pharmacol.* 68, 327-337.

Nayler, W.G. (1973) An effect of ouabain on the superficially-located stores of calcium in cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 5, 101-110.

Noble, D. (1980) Mechanism of action of therapeutic levels of cardiac glycosides. *Cardiovasc. Res.* 14, 495-514.

Ohba, M. (1975) Spontaneous rhythmic activity of the smooth muscle of the guinea-pig stomach and effects of ionic environment. In *Smooth Muscle Pharmacology and Physiology* Vol. 5, Worcel, M. and Vassort, G., editors, INSERM, Paris, 301-316.

Okita, G.T. (1977) Dissociation of Na,K-ATPase inhibition from digitalis inotropy. *Fed. Proc.* 36, 2225-2230.

Opit, L.J., Potter, H. and Charnock, J.S. (1966) The effect of anions on (Na + K)-activated ATPase. *Biochem. Biophys. Acta.* 120, 159-161.

Ozaki, H., Ishida, Y. and Urakawa, N. (1978) Properties of contractions induced by ouabain and K-free solution in guinea-pig taenia coli. *Eur. J. Pharmacol.* 50, 9-15.

Ozawa, H. and Katsuragi, T. (1974) Ouabain-induced potentiation on the contractions of the guinea-pig vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 25, 147-154.

Pamrani, M.B., Clough, D.L. and Haddy, F.J. (1978) Altered activity of the sodium-potassium pump in arteries of rats with steroid hypertension. *Clin. Sci. Mol. Med.* 55, 41s-43s.

Pfaffman, M., Urakawa, N. and Holland, W.C. (1965) Role of metabolism in K-induced tension changes in guinea pig taenia coli. *Am. J. Physiol.* 208, 1203-1205.

Pfaffman, M. and Holland, W.C. (1966) Effects of ouabain and 2,4-dinitrophenol on Ca exchange in taenia coli. *Am. J. Physiol.* 211, 400-402.

Pitts, B.J.R. (1979) Stoichiometry of sodium-calcium exchange in cardiac sarcolemmal vesicles coupling to the sodium pump. *J. Biol. Chem.* 254, 6232-6235.

Poole-Wilson, P.A. and Langer, G.A. (1975a) Glycoside inotropy in the absence of an increased K efflux. *Circ. Res.* 37, 390-395.

Poole-Wilson, P.A. and Langer, G.A. (1975b) Effect of pH on ionic exchange and function in rat and rabbit myocardium. *Am. J. Physiol.* 229, 570-581.

- Post, R.L., Merritt, C.R., Kinsolving, C.R. and Albright, C.D.** (1960) Membrane adenosinetriphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in human erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 235, 1796-1802.
- Prindle, K.H., Skelton, C.L., Epstein, S.E. and Marcus, F.I.** (1971) Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropic effect of tritiated digoxin. *Circ. Res.* 28, 337-345.
- Racker, F.** (1980) Fluxes of Ca and concepts. *Fed. Proc.* 39, 2422-2426.
- Raeymaekers, L., Wuytack, F. and Casteels, R.** (1974) Na-Ca exchange in taenia coli of guinea-pig. *Pflüger's Arch.* 347, 329-340.
- Repke, K., Est, M. and Portius, H.J.** (1965) Über die Ursache der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. 14, 1785-1802.
- Requena, J., DiPolo, R., Brinley, F.J. and Mullins, L.J.** (1977) The control of ionized calcium in squid axons. *J. Gen. Physiol.* 70, 329-353.
- Requena, J. and Mullins, L.J.** (1979) Calcium movement in nerve fibres. *Quart. Rev. Biophys.* 12, 371-460.
- Reuter, H. and Seitz, N.** (1968) The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J. Physiol.* 195, 451-470.
- Reuter, H., Blaustein, M.P. and Haeusler, G.** (1973) Na-Ca exchange and tension development in arterial smooth muscle. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 265, 87-94.
- Robinson, J.D.** (1976) (Ca + Mg)-stimulated ATPase activity of a rat brain microsomal preparation. *Arch. Biochem. Biophys.* 176, 366-374.
- Rosenberger, L.B. and Triggle, D.J.** (1978) Calcium, calcium translocation and specific Ca antagonists. In *Calcium in Drug Action*, Weiss, G.B., editor, Plenum Press, New York, 3-31.

Ruffolo, R.R. and Patil, P.N. (1979) Kinetics of alpha-adrenoceptor blockade by phentolamine in the normal and denervated rabbit aorta and rat vas deferens. *Blood Vessels* 16, 135-143.

Scarpa, A. and Graziotti, P. (1973) Mechanism for intracellular calcium regulation in heart. *J. Gen. Physiol.* 62, 756-772.

Schlaffer, S., Safer, B. and Williamson, J.R. (1972) Investigation of the role of mitochondria in the cardiac contraction-relaxation cycle. *FABS letter* 23, 125-130.

Schatzmann, H.J. (1953) Herzglycoside als Hemmstoffe für den aktiven Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocyten-membrane. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 11, 346-354.

Schatzmann, H.J. and Ackermann, H. (1961) Die strophantinwirkung am Darmmuskel und ihre Beziehung zum Kationengehalt des Mediums. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 19, 196-213.

Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C. (1975) The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* 27, 3-134.

Shimizu, K., Kurosu, Y., Nakajo, S. and Urakawa, N. (1979) Species difference in the ouabain sensitivity of the small intestine in contractile response. *Jpn. J. Vet. Sci.* 41, 139-149.

Shimo, Y., Porter, M.T. and Holland, W.C. (1968) Effect of ouabain on calcium exchange and tension in taenia coli. *Am. J. Physiol.* 214, 804-807.

Shlafer, M., Somani, P., Pressman, B.C. and Palmer, R.F. (1978) Effects of the carboxylic ionophore monensin on atrial contractility and Ca regulation by isolated cardiac microsomes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10, 333-346.

Shlafer, M. and Kane, P. (1980) Subcellular actions and potential adverse cardiac effects of the cardiotonic ionophore monensin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 567-573.

Skou, J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from peripheral nervous. *Biochim. Biophys. Acta.* 23, 394-401.

Skou, J.C. (1965) Enzymatic basis for active transport of Na and K across cell membrane. *Physiol. Rev.* 45, 596-617.

Skou, J.C. and Hilberg, C. (1965) The effect of sulphhydryl-blocking agents and of urea on the (Na + K)-activated enzyme system. *Biochim. Biophys. Acta.* 110, 359-369.

Skou, J.C. (1971) Sequence of steps in the (Na + K)-activated enzyme system in relation to sodium and potassium transport. *Current Topics Bioenergetics* 4, 357-398.

Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1970) Vascular smooth muscle. II Pharmacology of normal and hypertensive vessels. *Pharmacol. Rev.* 22, 249-352.

Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1981) Calcium storage sites and elemental distribution in smooth muscle. In *Advance in Pharmacology and Therapeutics II*, Yoshida, H., Hagihara, Y. and Ebashi, S., editors, Pergamon Press, Oxford, 55-59.

Spann, J.F., Sonnenblick, E.H., Cooper, T., Chidsey, C.A., Willman, V.L. and Braunwald, E. (1966) Studies on digitalis. XIV. Influence of cardiac norepinephrine stores on the response of isolated heart muscle to digitalis. *Circ. Res.* 19, 326-331.

Spector, S., Tarver, J. and Berkowitz, B. (1972) Effect of drugs and physiological factors in the disposition of catecholamines in blood vessels. *Pharmacol. Rev.* 24, 191-202.

Sulakhe, P.V. and Louis, P.J. (1980) Passive and active calcium fluxes across plasma membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 35, 135-194.

砂野 哲 (1980) 平滑筋と強心配糖体. *日平滑筋誌* 16, 57-70.

Sutko, J.L., Besch, H.R., Bailey, J.C., Zimmerman, G. and Watanabe, A. (1977) Direct effects of the monovalent cation ionophore monensin and nigericin on myocardium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 203, 685-700.

Tada, M., Yamamoto, T. and Tonomura, Y. (1978) Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 58, 1-79.

Thomas, R.C. (1972) Electrogenic sodium pump in nerve and muscle cells. *Physiol. Rev.* 52, 563-594.

Tillisch, J.H., Fung, L.K., Hom, P.M. and Langer, G.A. (1979) Transient and steady state effects of sodium and calcium on myocardial contractile response. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 11, 137-148.

Tobin, T., Akera, T., Ku, D., Brody, S.L. and Brody, T.M. (1975) Cassaine: mechanism of Na⁺K-ATPase and relationship of this inhibition to cardiotonic actions. *Eur. J. Pharmacol.* 32, 133-145.

Toda, N. (1972) Contractile response of isolated rabbit aortae to transmural stimulation as affected by calcium, strontium, sodium and ouabain. *Jpn. J. Pharmacol.* 22, 347-357.

Turlapaty, P.D.M.V., Altura, B.T. and Altura, B.M. (1978) Influence of Tris on contractile responses of isolated rat aorta and portal vein. *Am. J. Physiol.* 235, H208-H213.

Turlapaty, P.D.M.V., Altura, B.T. and Altura, B.M. (1979a) Interactions of tris buffer and ethanol on agonist-induced responses of vascular smooth muscle and on calcium-45 uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211, 59-67.

Turlapaty, P.D.M.V., Altura, B.T. and Altura, B.M. (1979b) Effects of Tris on vascular smooth muscle (Reply). *Am. J. Physiol.* 237, H410-H411.

上桎 帝一, 森田 慶治 と 石山 太朗 (1977) 心筋ミトコンドリアと Ca^{++} .
日本臨床 59, 59-65.

Urakawa, N., Ikeda, M., Saito, Y. and Sakai, Y. (1968) Effects of calcium depletion on oxygen consumption in guinea-pig taenia coli. *Jpn. J. Pharmacol.* 18, 500-508.

Urakawa, N., Ikeda, M., Saito, Y. and Sakai, Y. (1969) Effects of factors inhibiting tension development on oxygen consumption of guinea-pig taenia coli. *Jpn. J. Pharmacol.* 19, 578-586.

Urakawa, N., Karaki, H. and Ikeda, M. (1970) Effects of ouabain and metabolic inhibiting factors on Ca distribution during K-induced contracture in guinea pig taenia coli. *Jpn. J. Pharmacol.* 20, 360-366.

浦川 紀元 と 尾崎 博 (1981) 平滑筋収縮と細胞内 Na^{+} に
ついて. 日平滑筋誌 17, 1-26

Urquilla, P.R., Westfall, D.P., Goto, K. and Fleming, W.W. (1978) The effects of ouabain and alterations in potassium concentration on sensitivity to drugs and membrane potential of the smooth muscle of the guinea-pig and rat vas deferens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207, 347-355.

van Breemen, C., Farinas, B.R., Gerba, P. and McNaughton, E.D. (1972) Excitation contraction coupling in rabbit aorta studied by the lanthanum method for measuring cellular ^{45}Ca influx. *Circ. Res.* 30, 44-53.

van Breemen, C., Farinas, B.R., Casteels, R., Gerba, P., Wuytack, F. and Deth, R. (1973) Factors controlling cytoplasmic Ca concentration. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 267, 57-71.

van Breemen, C., Wuytack, F. and Casteels, R. (1975) Stimulation of ^{45}Ca efflux from smooth muscle cells by metabolic inhibition and high K depolarization. *Pflüger's Arch.* 359, 183-196.

van Breemen, C., Aaronson, P. and Loutzenhizer, R. (1979) Sodium-calcium interaction in mammalian smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 30, 167-208.

van Breemen, C., Hwang, O. and Meisheri, K.D. (1981) The mechanism of inhibitory action of diltiazem on vascular smooth muscle contractility. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 459-463.

Vanhoutte, P.M., Verbeuren, T.J. and Webb, R.C. (1981) Local modulation of adrenergic neuroeffector interaction in the blood vessel wall. *Physiol. Rev.* 61, 151-247.

van Winkle, W.B. and Schwartz, A. (1976) Ions and inotropy. *Ann. Rev. Physiol.* 38, 247-272.

Wakabayashi, S. and Goshima, K. (1981a) Kinetic studies on sodium-dependent calcium uptake by myocardial cells and neuroblastoma cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta.* 642, 158-172.

Wakabayashi, S. and Goshima, K. (1981b) Comparison of kinetic characteristics of Na-Ca exchange in sarcolemmal vesicles and cultured cells from chick heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 645, 311-317.

Webb, R.C. and Bohr, D.F. (1979) Potassium relaxation of vascular smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels* 16, 71-79.

Wei, J.W., Janis, R.A. and Daniel, E.E. (1976) Studies on subcellular fractions from mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats: alteration in both calcium uptake and enzyme activities. *Blood Vessels* 13, 293-308.

Weingart, R., Kass, R.S. and Tsien, R.W. (1978) Is digitalis inotropy associated with enhanced slow inward current ? *Nature* 273, 389-392.

Weiss, G.B. (1975) Stimulation with high potassium. In *Methods in Pharmacology*, Daniel, E.E. and Paton, D.M., editors, Plenum Press, New York, 339-345.

Weiss, G.B. (1977) Calcium and Contractility in Vascular Smooth Muscle. In *Advances in General and Cellular Pharmacology*, Narahashi, T. and Bianchi, C.P., editors, Plenum Press, New York, 71-154.

Weiss, G.B. (1981) Sites of action of calcium antagonists in vascular smooth muscle. In *New Perspectives on Calcium Antagonists*, Weiss, G.B., editor, American Physiological Society, Bethesda, 83-94.

Widdicombe, J.H. (1981) The ionic properties of the sodium pump in smooth muscle. In *Smooth Muscle*, Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T., editors, Edward Arnold, London, 93-104.

Wilbrandt, Von W. and Koller, H. (1948) Die Calciumwirkung am Froschherzen als Funktion des Ionengleichgewichts zwischen Zellmembran und Umgebung. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* 6, 208-221.

Yamashita, T., Tsuji, J. and Tomita, G. (1971) Reactivation of the Hill reaction of Tris-treated chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 12, 117-126.

山本勝裕と藪英世 (1979) モルモット小腸平滑筋細胞膜の分離 *札幌医誌* 48, 251-259

吉岡亨と竹中敏 (1979) 興奮性膜のナトリウムチャネル代謝 *16*, 285-293