

モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットにおける肺動脈平滑筋細胞の膜イオン電流の変化に関する実験的検討

村木里誌^{1),2)} 當瀬規嗣¹⁾

¹⁾ 札幌医科大学医学部生理学第1講座 (主任 藪英世教授)

²⁾ 札幌医科大学医学部外科学第2講座 (主任 安倍十三夫教授)

Experimental Study on Alteration of Membrane Ionic Currents in Pulmonary Arterial Myocytes from Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertensive Rat

Satoshi MURAKI^{1),2)} and Noritsugu TOHSE¹⁾

¹⁾ *First Department of Physiology, Sapporo Medical University School of Medicine*
(Chief : Prof. H. YABU)

²⁾ *Second Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine*
(Chief : Prof. T. ABE)

ABSTRACT Pulmonary hypertension (PH) caused by an idiopathic process or various cardiopulmonary disorders is well known to be a fatal disease which is correlated with increased patient mortality. Despite its severity and difficulties in treatment or management, the physiological basis of PH has not been understood completely. The present study was undertaken to examine the changes in ionic currents of pulmonary artery smooth muscle cell (PASM), under the pathological condition of PH. As an animal model of PH, monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats were produced by single subcutaneous injection of 60 mg/kg monocrotaline (MCT). To confirm that PH developed successfully on the experimental days (18-21 days) after the treatment with MCT, right ventricular systolic pressure was measured as an indicator of pulmonary artery pressure. The whole cell patch clamp method was applied to single PASM freshly isolated from the main pulmonary artery along with some intrapulmonary branches of MCT injected rats (MCT rats) and saline injected control rats (Saline rats). Resting membrane potential of PASM was not different between the two groups in the current-clamp mode. Outward currents elicited by depolarizing test pulse from a holding potential of -43 mV were remarkably smaller in MCT rats than in Saline rats, using patch pipettes with 0.1 mM EGTA. On the other hand, when the pipette contained 10 mM EGTA, the outward currents were almost similar between the two groups. To identify the component responsible for the reduction of outward currents, the effect of inhibitors of K^+ currents were examined. Nisoldipine ($1 \mu\text{M}$), which indirectly inhibits Ca^{2+} -activated K^+ channel by blocking L-type Ca^{2+} channels, was less effective in MCT rats than in Saline rats. Tetraethylammonium (5 mM), selective Ca^{2+} -activated K^+ channel inhibitor, was also less effective in MCT rats than in Saline rats. In contrast, 4-aminopyridine (4 mM), selective voltage gated K^+ channel inhibitor, was almost equally effective on both. The current density of L-type Ca^{2+} channel current in MCT and Saline rats was also investigated using $1 \mu\text{M}$ nisoldipine. Ca^{2+} currents were small in MCT rats. Because elevation of cytoplasmic Ca^{2+} concentration of PASM is expected under the pathological condition of PH, all these results suggest that elevation of cytoplasmic Ca^{2+} leads to a reduction of Ca^{2+} -activated K^+ currents and Ca^{2+} currents in PASM.

(Received October 6, 1997 and accepted October 17, 1997)

Key words: Pulmonary hypertension, Monocrotaline, Electrophysiology

1 緒 言

肺高血圧症 (PH) は原発性あるいは続発性に生じ、慢性的な肺動脈圧の上昇による右心不全症状の惹起や、また時に肺高血圧危機 (PH crisis) と呼ばれる急激な肺動脈圧の上昇と循環動態の悪化を見ることがあり、ことに先天性心疾患の治療、管理の上で困難な病態である¹⁻⁴⁾。PH 病態下の肺動脈の病理組織学的研究では、末梢小動脈への平滑筋組織の増生と血管中膜の肥厚、それに伴う血管径の狭小化あるいは小血管の消失、血栓化などが報告されている⁵⁻⁸⁾。一方、PH 病態下の肺動脈の機能的変化に関する研究も、いくつか報告されている。臨床的には血中エンドセリン-1 (ET-1) 濃度の上昇が示されているが⁹⁾、ラット PH モデルを用いた研究では¹⁰⁾、PH の進行に伴う ET-1 に対する血管収縮反応の低下が示され、一方、ET_A レセプター拮抗薬が PH の進行を抑制することが報告されている。また別の報告では¹¹⁾、PH 病態下の肺動脈は、アンジオテンシン II や 5-HT による収縮反応が増強しているという。こういった肺動脈平滑筋細胞 (PASMC) の機能的変化と、PH 病態の進行の間には密接な関係があると推測される。血管平滑筋の機能において、細胞膜上のイオンチャンネルは膜電位の制御、細胞内 Ca²⁺ の制御などを行い、重要な役割を演じている。すでに正常ラット及びウサギの PASMC においては、電位依存性 K⁺ チャンネル (K_v)、Ca²⁺ 依存性 K⁺ チャンネル (K_{Ca})、ATP 依存性 K⁺ チャンネル (K_{ATP})、Ca²⁺ 依存性 Cl⁻ チャンネルの 4 種類の外向き電流が報告されており、前 2 者が細胞の静止膜電位形成に強く関与している¹²⁻¹⁷⁾。また内向き電流として Ca²⁺ チャンネル電流が報告されており^{18,19)}、それによる Ca²⁺ 流入は、平滑筋収縮のために重要な Ca²⁺ 源となっている。

血管平滑筋の膜イオン電流の病態下での変化に関しては、自然発症高血圧ラット (SHR) を用いた全身高血圧病態下の静脈平滑筋細胞の検討が有名である²⁰⁾。その報告によれば、T 型 Ca²⁺ 電流が増大していることが観察されている。一方、PH の成因の一つである慢性低酸素に暴露されたラットの PASMC において遅延整流性 K⁺ チャンネル (K_{DR}) 電流の減少が報告されている¹²⁾。

PH に関する研究では、PH の動物モデルとしてモノクロタリン (MCT) 誘発 PH ラットが一般によく用い

られ、検討されている^{8,10,11,21-26)}。植物中に存在するアルカロイドである MCT は、投与後 14 日以降に PH が誘発される薬剤として用いられており、肺における毛細血管内皮の障害と、動脈中膜層の肥厚、また血管内での血栓集積を来すために PH を発症するものと報告されている^{10,11,21,22,25,26)}。この MCT 誘発 PH ラットの肺動脈の電気生理学的性質に関しては、微小電極法により肺動脈の静止膜電位を測定した報告があり²³⁾、PH の進行に伴い、静止膜電位が脱分極するとされている。しかしながら、イオンチャンネルレベルの変化に関する検討はされていない。

本研究は MCT 誘発 PH ラットの PASMC 単離細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して膜イオン電流を検出し、その外向き電流、および Ca²⁺ チャンネル電流に関して、正常肺動脈ラットとの比較を行うことにより、PH 病態下に起こっている PASMC の膜イオン電流系の変化を明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2.1 肺高血圧症ラットの作製

体重 150 g から 200 g、生後 6 週の Wister 雄性ラットを用いた。先の報告で^{10,11,21,22)}、MCT 一回投与による肺の組織学的変化と、それにより惹起されると考えられる PH は、少なくとも 1 カ月以上持続するとされている。そこで本実験では MCT 60 mg/kg を 0.6 ml の生理食塩水溶液として 1 回皮下投与を行い、18~21 日目に観血的に右室収縮期圧を測定することにより PH の発症を確認した。同量の生理食塩水を皮下投与し、18~21 日間飼育したラットを用い、対照群とした。

2.2 右室収縮期圧の測定

MCT または生理食塩水皮下投与後 18~21 日目のラットをペントバルビタール 50 mg/kg の腹腔内投与にて麻酔し、気管切開を施行後、人工呼吸器 (Harvard, Inc. USA, Respirator 683) を用いて、1 回換気量 10 ml/kg、呼吸回数 60 回/分にて換気を維持した。腹部正中切開にて腹部大動脈を、胸骨横切開及び肋間開胸にて右心室を露出し、それぞれに 22 ゲージ留置針を挿入した後、圧トランスデューサー (Model 59-DTS-H, American Edwards) に連結し、多用途監視装置 (CS-800, フクダ電子) にて体血圧 (Ps) と右室収縮期圧 (P_{RVs}) を同時測定した。肺動脈の損傷を避けるため針

の挿入は右室流出路にとどめ、 P_{rvs} をもって肺動脈収縮期圧の指標とした。

2・3 細胞の単離

観血的圧測定終了後、速やかに両肺と心臓を一塊に摘出し normal Tyrode 液 (Table 1) 中に浸した。心拍動により血管内腔の血液を除去した後、 Ca^{2+} -free Tyrode 液 (Table 1) 中に移し、肺動脈を第3分枝まで慎重に剝離し、実体顕微鏡下で周囲結合組織を除去した。この肺動脈切片を Ca^{2+} -free Tyrode 液中で20分間、 $37^{\circ}C$ でインキュベートして十分弛緩させ、引き続き 25 mg/ml のコラゲナーゼを含む Ca^{2+} -free Tyrode 液中で $50\sim 70$ 分間、 $37^{\circ}C$ でインキュベートした。この後、酵素処理によって柔らかくなった切片を Kraftbrühe (KB) 液 (Table 1) 中に移し、大口径のピペットにてゆっくりと吸引、排出を繰り返すことにより攪拌し、細胞を分散した。これをナイロンメッシュで濾過し、KB 液中で細胞懸濁液を作製した。これを実験に使用するまで $4^{\circ}C$ にて1時間保存した。実験は細胞単離後6時間以内に行った。また、細胞は灌流槽において紡錘形を保ったもののみを実験に供した。

2・4 パッチ電極

パッチ電極は芯入りガラス管を電極プラー (PP83, Narishige) で二段階に加熱牽引し、電極抵抗は $2\sim 5$

$M\Omega$ になるように作製した。電極内液 (pipette solution, Table 1) の充填はミリポアフィルターを通し、カテラン針を用いて電極後部より逆行性に行った。電極内液には、実験に応じて EGTA を 0.1 mM あるいは 10 mM 加えた。不関電極本体には内径 5 mm のガラス管を用い、内液には 1% の寒天で固めた $3M\text{ KCl}$ を用いた。

2・5 灌流槽ならびに灌流液の切り替え

倒立顕微鏡のステージ上に灌流槽を設置し、 Ca^{2+} -free Tyrode 液を灌流させ、いったん灌流を止めた上で単離した細胞を含む KB 液をパスツールピペットで槽内に滴下した。細胞が槽の底に付着した後、実験を開始した。槽への液の灌流は重力による自然落下で行い、灌流速度は槽と灌流液を入れたビーカーとの高低差によって調節した。なお槽内の液交換には約 1.5 分を要した。

2・6 ホールセルパッチクランプ法

膜電位、膜電流の記録はパッチクランプ用増幅器 (CEZ-2400, Nihon Kohden) を用いホールセルパッチクランプ法によって行った。パッチ電極をピペットホルダーに装着し、増幅器を voltage clamp mode とし -3 mV の電圧パルスを与えながら電極の先端を灌流槽に入れ、電極抵抗が $2\sim 5\text{ M}\Omega$ であることをはじめに確認した。その後、倒立顕微鏡下で3次元マニピュレー

Table 1 Composition of the used solutions (mM).

	Normal Tyrode	Ca^{2+} -free Tyrode	Cs^{+} Tyrode	Kraftbrühe (KB)	High- K^{+} pipette [†]	High- Cs^{+} pipette [†]
NaCl	143	143	143	—	—	—
KCl	5.4	5.4	—	40	130	—
CsCl	—	—	5.4	—	—	19.6
KOH	—	—	—	70	—	—
CsOH	—	—	—	—	—	110.4
$CaCl_2$	1.8	—	—	—	—	—
$BaCl_2$	—	—	10	—	—	—
$MgCl_2$	0.5	0.5	0.5	3.0	5.2	5.2
NaH_2PO_4	0.33	0.33	0.33	—	—	—
KH_2PO_4	—	—	—	20	—	—
<i>l</i> -Glutamate	—	—	—	50	—	112
Taurine	—	—	—	20	—	—
Na_2 -ATP	—	—	—	—	5.0	5.0
Glucose	5.5	5.5	5.5	10	—	—
EGTA	—	—	—	0.5	0.1 or 10	10
HEPES	5.0	5.0	5.0	10	10	10
pH	7.40*	7.40*	7.40**	7.30***	7.25***	7.25**

Solutions were titrated with NaOH (*), CsOH (**) and KOH (***). [†] Final concentration of K^{+} and Cs^{+} in pipette solutions were 144 mM .

ターを操作して細胞表面に軽く電極を当て、ポンプによる吸引によって電極内に陰圧をかけて細胞膜と電極先端とを密着させギガオーム (GΩ) シール状態を得た。この際、灌流液を Ca^{2+} -free Tyrode 液から normal Tyrode 液に切り替えることによりシールの完成を促進した。ギガオームシールが完成した段階で持続時間の短い大きな電圧パルス (1~3 msec, 1.5 V) を与えて細胞膜を破り、ホールセル状態とした。膜電位の測定は current clamp mode に切り替えることよって行い、膜電流は voltage clamp mode で記録した。全電流の記録に先立ち、細胞膜表面積を推定するため膜電気容量を測定した。膜電気容量は voltage clamp mode で保持電位 0 mV から持続時間 30 msec の過分極電圧パルスを 10 mV 加え、これに反応して得られた一過性の容量性充電電流の積分値 (電荷量) を電圧パルスの大きさを除して算出した。また全ての実験は 37°C で行った。得られた記録は DAT レコーダー (RD-120TE, TEAC) を用いて digital audio tape に記録保存し、再生した記録は 1 kHz のローパスフィルターを通し AD 変換器 (ADX-98E, Canopus Electronics) によって 2.5 kHz でデジタル信号に変換して解析に供した。その解析にはパーソナルコンピュータ (PC98XA, NEC) を用いた。

2.7 細胞内液および細胞外液

電流の記録に際し使用した細胞内液 (電極内液)、細胞外液 (灌流液) は Table 1 に示した各溶液である。全電流および外向き電流の観察には、内液に high- K^+ pipette 液、外液に normal Tyrode 液を用いた。 Ca^{2+} 電流の観察には、 K^+ 電流を抑制する目的で、内液と外液双方の K^+ を Cs^+ で置換した high- Cs^+ pipette 液、 Cs^+ Tyrode 液を各々使い、外液には Ca^{2+} チャネル透過性の高い 10 mM の Ba^{2+} を加えて電流を増幅した。各実験条件における電極内液と灌流液との間には junction potential が生じるため、あらかじめその値を計測し、全電流の記録では -3 mV、 Ca^{2+} 電流の記録では -6 mV の偏位電位を補正した値として、結果に記した。また、両群に対する各薬剤投与は、normal Tyrode 液に各濃度の薬剤を添加した外液を用いることで行った。

2.8 薬 剤

使用した主な薬剤は以下の通りである。Monocrotaline (Extrasynthese), collagenase (和光純薬工業), O, O'-Bis (2-aminoethyl) ethyleneglycol-N, N, N'-N'-tetraacetic acid (EGTA) (同仁科学研究所), 4-aminopyridine (4-AP) (Sigma), tetraethylammonium (TEA) (和光純薬工業), niflumic

acid (Sigma), nisoldipine (Bayer)。

2.9 統 計

得られた値は平均値±標準誤差で表記した。統計学的有意差は、群間同一電位における薬剤の効果は paired-*t* 検定を、2 群間の圧、膜容量、及び同一電位における電流密度は unpaired-*t* 検定を、静止膜電位は one way factorial ANOVA (Fishers PLSD) を、2 群間の各薬剤による効果は two way repeated measures ANOVA を用いて検討し、*P* 値が 0.05 より小さいときをもって、有意差ありと判定した。

3 結 果

3.1 右室収縮期圧

MCT 及び生理食塩水の皮下投与を実施後、18~21 日目において、観血的圧測定により右室収縮期圧を測定した。生理食塩水を投与したラット群 (以下 Saline 群と略す) では 20.8 ± 1.9 mmHg ($n=15$), MCT を投与したラット群 (以下 MCT 群と略す) では 38.6 ± 3.1 mmHg ($n=15$) であり、MCT 群で有意に上昇していた (Fig. 1A)。一方、体血圧は MCT 群で有意に低下しており (Fig. 1B)、肺高血圧症の指標である肺体血圧比 (Prvs/Ps) の値は MCT 群で有意な上昇を認め (Fig. 1C)、以前の報告と同様に¹⁰⁾、MCT 投与後 18~21 日目における肺動脈圧の選択的上昇による肺高血圧症の発症が確認された。

3.2 膜電気容量

方法に述べたごとく、パッチクランプ法による膜電位固定実験を用いて、単離された PASM C の膜電気容量を測定した。膜電気容量は Saline 群と MCT 群との間に有意差を認めず (Table 2)、細胞の大きさには変化がないと考えられた。

3.3 電流電圧特性の比較

MCT 群と Saline 群で膜電流系を比較するため、voltage clamp mode で電流を記録した。全例において電流の記録に先立ち current clamp mode による静止膜電位の記録を行った。灌流液は normal Tyrode 溶液とし、電極内液は high- K^+ pipette 溶液で EGTA を 10 mM 含んだものを用いた。記録された膜電位は、Table 2 に示す様に MCT 群と Saline 群との間で有意差を認めなかった。

膜電位固定実験の電位コマンドのプロトコールは、まず膜電位を -43 mV に保持し、そこから持続時間 300 msec の電圧パルスを 10 mV ごとに -113 mV から +27 mV の範囲で加えた。パルスは 10 秒毎に与え、細胞への負担を避けた。Saline 群、MCT 群各々における全電

流の実記録例を Fig. 2A に示す。保持電位より脱分極側へパルスを与えると、電位依存性に増大する外向き電流が観察された。この外向き電流は速い立ち上がり

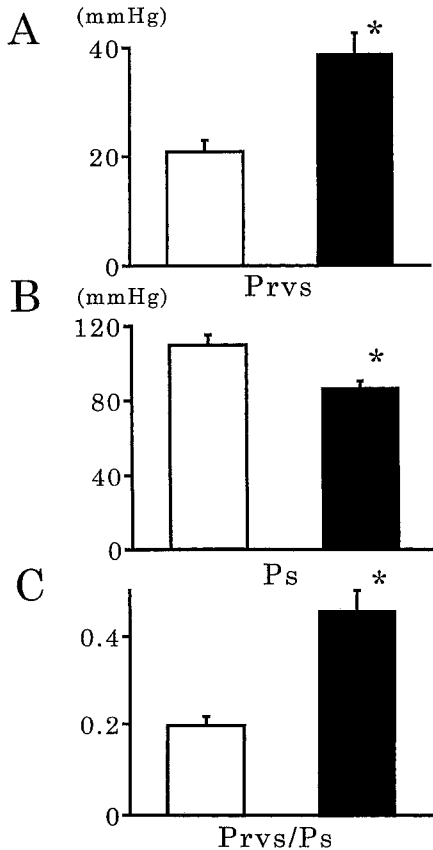


Fig. 1A: The average values of right ventricular systolic pressure (Prvs). B: Change in systemic pressure (Ps). Prvs was significantly elevated in monocrotaline injected rats (MCT, ■) (n=15) than in saline injected rats (Saline, □) (n=15). Ps was significantly lower in MCT than in Saline. C: The average values of Prvs-to-Ps ratio (Prvs/Ps). Prvs/Ps was significantly higher in MCT. Data are shown as mean±SEM. $P < .01$ vs. Saline.

と、それに引き続くゆっくりとした減弱を示したため、立ち上がりの頂点における電流を peak current (Peak), パルスの終了直前の電流を pulse end current (Pulse end) として、各電位における電流電圧曲線を描いた (Fig. 2B, C)。細胞膜単位面積あたりの電流量を知る目的で、膜電気容量あたりの電流量 (電流密度) を算出して用いた。-43 mV より脱分極電位側における電流密度は Saline 群 (n=33) に比して MCT 群 (n=30) で減少する傾向を示したが、統計学的有意差は Pulse end の -13 mV 及び -3 mV 電位においてのみ認められた (Fig. 2C)。保持電位より過分極側にパルスを与えると、わずかな内向き電流が認められるが、この電流は両群間に有意な差はなかった。

両群で観察された外向き電流は、ともに電位依存性 K^+ チャネルの抑制薬である 4-AP (4 mM) により有意に抑制され (Fig. 3A, B), その効果は両群間に有意差を認めなかった (Fig. 3C)。従って、本実験において検討した PASMCMC には、従来の報告通りに^{13,14)}、電位依存性 K^+ チャネルが存在するが、この電流自体は PH 病態に影響を受けないと考えられた。

3.4 Ca^{2+} チャネル電流の検討

血管平滑筋の Ca^{2+} チャネル電流は細胞内外の生理的イオン環境下ではごく小さく、定量的評価は困難である²⁷⁾。そこで、PASMCMC の Ca^{2+} チャネル電流を増幅させて観察するため、方法に述べたごとくに、 K^+ 電流を抑制した上で細胞外液に 10 mM の Ba^{2+} を加え、この Ba^{2+} が Ca^{2+} チャネルを通過する際に記録できる内向き電流を、 Ca^{2+} チャネル電流として観察した。保持電位 -86 mV から持続時間 300 msec の脱分極パルスを 10 mV ごとに -76 mV から +54 mV の範囲で加え、一過性的内向き電流を記録した後、dihydropyridine 型 Ca^{2+} チャネル拮抗薬である nisoldipine (1 μ M) を投与すると内向き電流は完全に抑制された。この抑制された内向き電流成分を L 型 Ca^{2+} チャネル電流とみなし、nisoldipine 投与前の電流記録から投与後の電流記録を subtraction し、nisoldipine 感受性 Ca^{2+} チャネル電流

Table 2 Resting membrane potential and cell capacitance of single rat pulmonary arterial myocytes.

group	cell capacitance (pF)	resting membrane potential (mV)	
		EGTA 0.1 mM	EGTA 10 mM
Saline (n=79)	30.6±1.8	-48.5±1.8 (n=46)	-46.2±1.3 (n=33)
MCT (n=57)	31.4±1.0	-48.2±2.3 (n=27)	-48.7±2.6 (n=30)

Saline; saline-injected control rats, MCT; monocrotaline-injected rats. Resting membrane potential was recorded under two different EGTA concentrations in pipettes. Values are mean±SEM. There were no significant differences among each group.

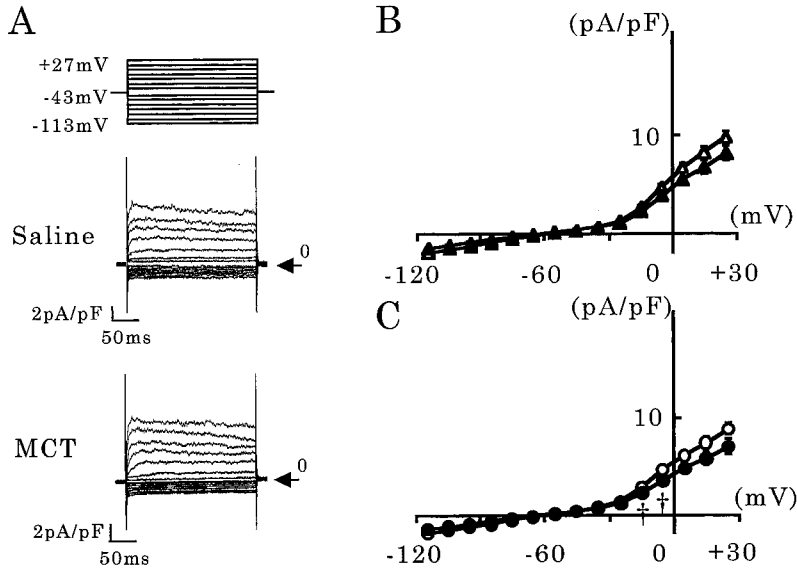


Fig. 2 Whole cell current recordings from single isolated myocytes of pulmonary artery from saline and MCT rats. Currents were evoked with 300 msec voltage steps to test potentials between -113 and $+27$ mV, in 10 mV increments, from a holding potential of -43 mV (upper panel in A). A: Representative recordings from saline rats (Saline, middle panel) and MCT rats (MCT, lower panel). The outward currents induced by depolarizing voltage steps reached peak amplitude (Peak) rapidly, and then slightly declined to the pulse end amplitude (Pulse end). B, C: Comparison of the current voltage relationship between Saline (\circ , \triangle) and MCT (\bullet , \blacktriangle). Peak current (\triangle , \blacktriangle)-voltage relationship and pulse end current (\circ , \bullet)-voltage relationship were shown in panel B and C, respectively. Whole cell currents were expressed as current density to normalize the currents to the cell capacitance. Outward current density was suppressed in MCT at each test potential between -23 and $+27$ mV, but statistically small only at -13 mV and -3 mV potential in Pulse end ($^*P < .05$) ($n=33$; Saline, $n=30$; MCT). All experiments were carried at 10 mM EGTA in the internal solution.

として、その特徴を Saline 群と MCT 群間で比較した。両群における subtraction の結果 (Fig. 4A) と、それにより求めたピーク電流の電流電圧特性の比較 (Fig. 4B) を示す。両群間において、 Ca^{2+} チャネル電流の閾電位 (-26 mV 付近)、最大電流を与える電位 ($+4 \sim +14$ mV 付近) に大きな差はないが、 Ca^{2+} チャネル電流が活性化される全範囲の電位 ($-26 \sim +44$ mV) において MCT 群の電流密度は小さかった。

3.5 EGTA 0.1 mM 条件での電流電圧特性の比較

PASMC には、細胞内 Ca^{2+} の上昇により活性化される Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが報告されている^{13,16),28-30)}。そこで電極内の EGTA を減じ (0.1 mM)、細胞内 Ca^{2+} がより生理的に変動し得る条件で電流を観察し、両群を比較することにした。まず current clamp mode で EGTA 0.1 mM 条件下での静置膜電位を測定した。Table 2 に示すように、MCT 群の膜電位は Saline 群における膜電位とほぼ同等の値を示し、両群間に有意差

を認めなかった。EGTA 10 mM 条件で記録された両群の膜電位と合わせて 4 群間で比較した結果でも、有意差を認めなかった。EGTA 10 mM 条件で行ったのと同様のパルスプロトコールで記録された電流密度は、低 EGTA 濃度の条件下、Saline 群で Pulse end, Peak 電流とも高 EGTA 濃度条件下より大きな外向き電流を認めたのに対し、MCT 群においては、両 EGTA 濃度条件下で大きな変化を認めなかった (Fig. 5A)。低 EGTA 濃度条件下での Saline 群と MCT 群の比較では、外向き電流を観察したすべての電位を通じて、Saline 群で大きな電流密度を呈し、統計学的有意差を認めた (Fig. 5B, C)。

3.6 各抑制薬の外向き電流に対する影響

上記のごとく、MCT 投与は低 EGTA 条件下に、PASMC の外向き電流を減少させると考えられたが、この PH 病態下に減少する電流成分は、EGTA を高濃度にして Ca^{2+} 緩衝を強くした際には認められないことか

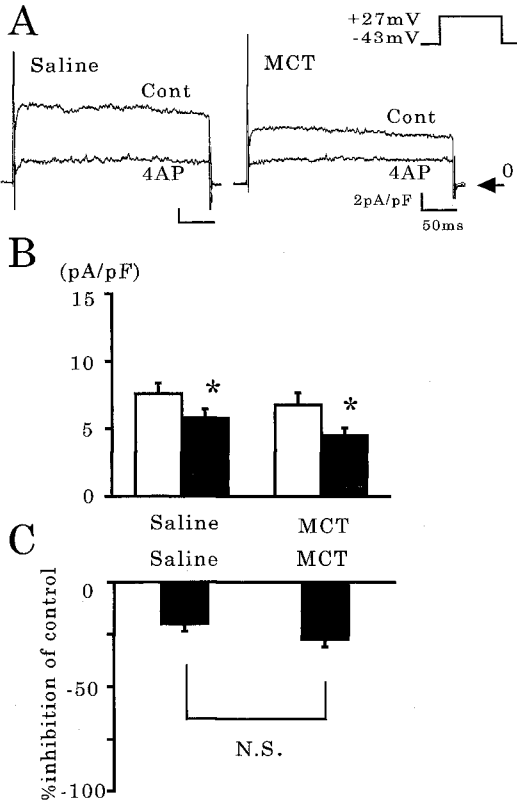


Fig. 3 Effects of 4-AP on outward currents in PASM. Current traces recorded during 300 msec depolarizations to +27 mV from a holding potential of -43 mV before (Cont) and after application of 4 mM 4-AP (4AP). A: Representative recordings in saline rats (Saline, left trace) and in MCT rats (MCT, right trace). 4-AP decreased the outward currents in PASM of both groups. The pipette contained 10 mM EGTA. B: Outward current densities at Pulse end elicited by depolarization to +27 mV before (□) and after (■) application of 4 mM 4-AP were compared between Saline (n=6) and MCT (n=8). Outward currents were significantly inhibited in both groups (* $P < .01$). C: Inhibitory effects of 4-AP were expressed as % inhibition of control. The inhibitory effect of 4-AP were not significantly different between MCT and Saline (N.S.).

ら Ca^{2+} 依存性電流と考えられた。そこで、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル抑制薬が、これらの外向き電流に与える影響を検討した。 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル電流 ($I_{K,ca}$) に対する直接的抑制薬として TEA (5 mM) を、また dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネル電流は間接的に $I_{K,ca}$ にも少なからず寄与していることが報告されてお

り²⁹⁾、その選択的抑制薬である nisoldipine (1 μ M) を投与し、外向き電流の変化を観察した。保持電位 -43 mV から持続時間 300 msec の電圧パルスをも 10 mV ごとに -33 mV から +27 mV の範囲で加えて、脱分極側の電位における外向き電流量の変化を、二種類の細胞内液 EGTA 濃度条件下に、投与前後で記録した。

Fig. 6 に両 EGTA 濃度条件下、+27 mV 電位において nisoldipine の投与前後に記録された外向き電流の実記録例を示す。EGTA 0.1 mM 条件下、+27 mV 電位での Pulse end 電流密度は nisoldipine の投与により、Saline 群で電流密度の大きな抑制を見たが、MCT 群ではあまり変化せず (Fig. 7A)、nisoldipine の抑制効果の差は両群間で有意 ($P < 0.01$, Fig. 7B) であった。細胞内液 EGTA 10 mM 条件下でも、nisoldipine の投与により、Saline 群で電流密度の明らかな抑制を見たが、MCT 群ではほとんど変化せず (Fig. 7A)、nisoldipine の抑制効果に両群間で有意差が認められた ($P < 0.05$, Fig. 7B)。

TEA についても同様の検討を行い、EGTA 濃度条件に関わらず、MCT 群においても有意な抑制効果が観察された (Fig. 8)。しかし、TEA 投与前後の電流密度の変化は、+27 mV 電位での Pulse end 電流密度の平均として比較すると、EGTA 0.1 mM 条件下に、Saline 群でより大きな減少を認め (Fig. 9A)、MCT 群における減少と比較して、抑制効果に両群間で有意差を認めた (Fig. 9B)。細胞内液 EGTA 10 mM 条件下では、Saline 群でやや大きな抑制が観察される傾向にあるものの (Fig. 9A)、両群間に TEA による抑制効果の有意差は認められなかった (Fig. 9B)。

一方、 Ca^{2+} 依存性電流の一つとして報告のある Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャンネル抑制薬の niflumic acid (50 μ M) についても検討したが、外向き電流の絶対量に有意な変化を及ぼさず、この電流の寄与はほとんどないと考えられた。

4 考 察

今回の実験結果により、PH 病態下に PASM が膜電流レベルでの変化を呈していることが示された。

4.1 肺高血圧症ラットモデルの検討

すべての実験に先立ち、観血的に測定した体血圧と右室収縮期圧から、MCT の一回皮下投与により肺高血圧症が誘発されたことを確認した。MCT 誘発肺高血圧症ラットは、肺高血圧症の実験モデルとして、慢性低酸素誘発肺高血圧症ラットとともに多く用いられている^{8,10,11,21-26)}。MCT の投与は組織学的に、肺血管の内

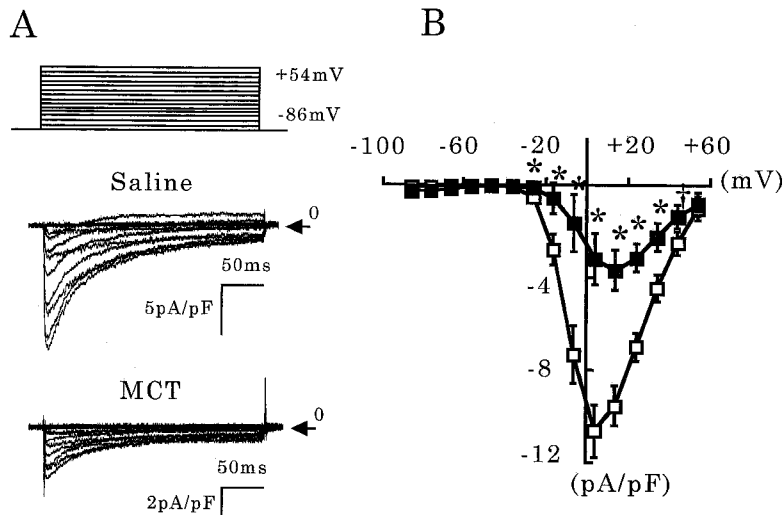


Fig. 4 Ba^{2+} currents through the nisoldipine ($1 \mu\text{M}$)-sensitive calcium channel. Currents were elicited with 300 msec depolarizing steps to test potentials ranging from -76 to $+54$ mV in 10 mV increments. A holding potential was -86 mV. The pipette contained 10 mM EGTA. A: Representative recordings from saline rats (Saline, middle panel) and MCT rats (MCT, lower panel). Nisoldipine-sensitive Ca^{2+} channel currents were obtained by subtracting currents in the presence of nisoldipine from those in the absence of nisoldipine. B: Comparison of the current-voltage relationship between Saline (\square) and MCT (\blacksquare) groups. The current densities were significantly small in MCT at test potentials between -26 mV and $+34$ mV ($*P < .01$), and $+44$ mV ($^{\dagger}P < .05$) ($n=7$; Saline, $n=9$; MCT).

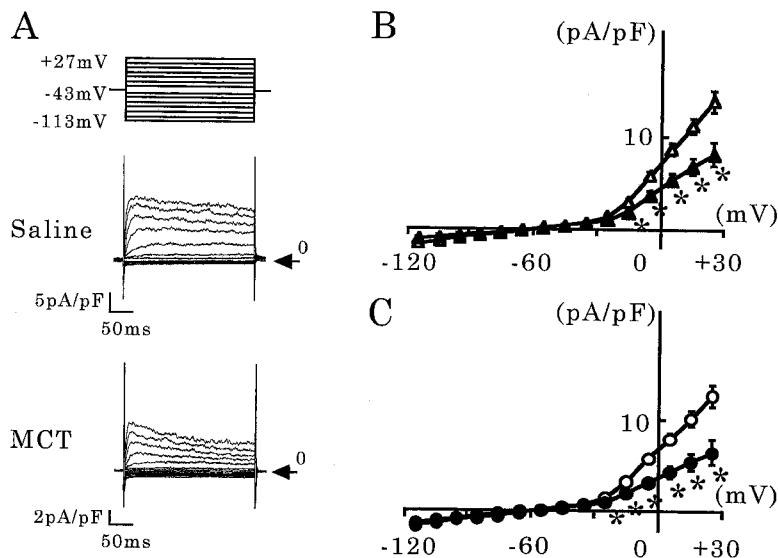


Fig. 5 Current recordings of single isolated myocytes of pulmonary artery at 0.1 mM EGTA in the internal solution. The pulse protocol used in this experiment was the same as described in Fig. 2 (also shown in the upper panel in A). A: Representative recordings from saline rats (Saline, middle panel) and MCT rats (MCT, lower panel). Outward current density was much greater in Saline, than that in MCT. B, C: Comparison of the current-voltage relationship between Saline (\circ , \triangle) and MCT (\bullet , \blacktriangle). Peak current (\triangle , \blacktriangle)-voltage relationship and pulse end current (\circ , \bullet)-voltage relationship were shown in panel B and C, respectively. Whole cell currents were expressed as current densities. Outward current density was markedly small in MCT from -13 mV to $+27$ mV potential in Peak, and from -23 mV to $+27$ mV potential in Pulse end ($*P < .01$) ($n=46$; Saline, $n=27$; MCT).

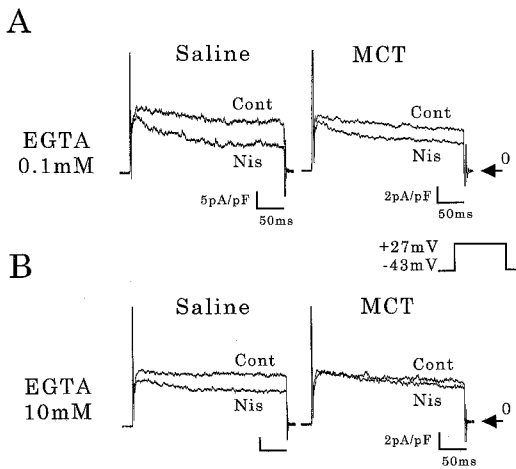


Fig. 6 Effects of nisoldipine on outward currents. Current traces recorded during 300 msec depolarizations to +27 mV from a holding potential of -43 mV before (Cont) and after application of 1 μ M nisoldipine (Nis). Representative recordings at 0.1 mM EGTA (panel A) and at 10 mM EGTA (panel B) in the pipette solution from saline rats (Saline, left traces) and MCT rats (MCT, right traces). The inhibitory effects were observed to be greater in Saline than in MCT.

皮細胞障害と中膜の肥厚, さらには血栓化を来すことが報告されており^{10,11,21,22,25,26}, その結果として肺高血圧症を招来すると推定されているが, その病理組織学的変化は肺高血圧症一般に見られる変化と一致する⁵⁻⁸. 従って, 今回用いた実験モデルは, PH 病態下での PASM C の変化を検討するのに適当であると考えられた.

4.2 細胞容積の変化

PH において観察される肺動脈の組織学的変化は, 動脈中膜の肥厚が一つの所見であり⁵⁻⁸, 今回用いた MCT 誘発肺高血圧症ラットの肺動脈においても, 肉眼的に動脈壁の肥厚を呈していたが, 膜電気容量から推定された細胞容積は, 両群とも約 30 pF とほぼ一致した. 本実験では組織学的検討を行っていないが, PH 病態下に見られる肺動脈壁の肥厚は, 個々の平滑筋細胞の肥大を伴うものではなく, 結合織の増加など, 他の要因によるものであると考えられた.

4.3 静止膜電位の変化

Current clamp mode で測定された静止膜電位 (E_r) は, 両群間に差を認めず, ピペット内液 EGTA 濃度にも影響を受けなかった. MCT 投与後のラット肺動脈多細胞標本における E_r の変化を, 微小電極法を用いて検

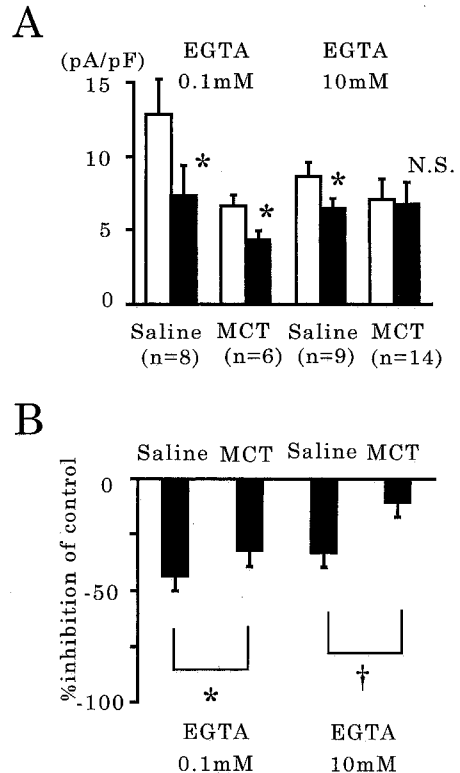


Fig. 7 Comparison of the inhibitory effect of nisoldipine on outward currents. A: Mean outward pulse end current densities elicited by depolarization to +27 mV before (\square) and after (\blacksquare) application of 1 μ M nisoldipine were compared between Saline and MCT, at each EGTA concentration. Outward currents were significantly inhibited in both groups ($*P < .01$) except for MCT at 10 mM EGTA (N.S.). B: Mean inhibitory effects were expressed as % inhibition of control for Saline and MCT, at each EGTA concentration. The effect of nisoldipine was significantly smaller in MCT than in Saline at both concentrations of EGTA ($*P < .01$, $\dagger P < .05$).

討した過去の報告によれば²³, 本実験と同量の MCT を投与後, 20 日以上経過した段階で, E_r は脱分極するとされる. しかし, 本実験で用いた MCT 投与後 18~21 日目のラットでは, 先に述べたように, 肺高血圧症が確立されているにもかかわらず, E_r は変化していなかった. MCT ラットの肺動脈における機能変化を検討した他の報告によれば¹¹, MCT 投与後 7~14 日目で, すでに薬剤反応性の変化が認められている. 本実験においても, PASM C のイオンチャネル抑制薬の効果を検討した結果では, 投与後 18~21 日目で, すでに PASM C が一定の変化を呈している. 従って, E_r の変化は

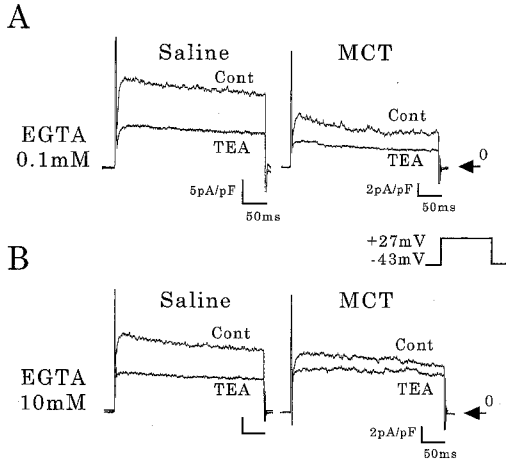


Fig. 8 Effects of TEA on outward currents. Current traces recorded during 300 msec depolarizations to +27 mV from a holding potential of -43 mV before (Cont) and after application of 5 mM TEA (TEA). Representative recordings at 0.1 mM EGTA (panel A) and at 10 mM EGTA (panel B) in the pipette solution from saline rats (Saline, left traces) and MCT rats (MCT, right traces). The inhibitory effects were observed to be greater in Saline than in MCT.

PASMC に起こり得る様々な変化の重複によって招来する二次的なものと考えられる。一方で、より長期間の PH にさらされた場合に PASMC に起こりうる変化が、 E_r の変化をきっかけとして惹起される可能性があるが、この点に関しては、更なる検討が必要であろう。

4.4 PASMC における膜電流系の変化

PASMC においては細胞を静止状態に維持し、血管の弛緩に働く機構として、遅延整流性 K^+ チャンネル電流 ($I_{K,DR}$)、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル電流 ($I_{K,Ca}$) の 2 つの外向き電流が主たる役割を演じていると報告されている¹³⁾。正常 PASMC に関し、各抑制薬の作用を検討した研究では、4-AP で $I_{K,DR}$ を抑制した場合に静止膜電位の脱分極を認めるのに対し、 K_{Ca} 抑制薬を投与しても静止膜電位に変化を来さないとの報告が見られ^{13,14)}、生理的条件下の PASMC においては、 $I_{K,DR}$ の寄与の程度の方がより大きいことが考えられる。従って、本実験の結果において、4-AP の投与による抑制効果に両群間で有意差を認めなかったことは、MCT 群の静止膜電位に変化が見られなかったことを裏付けるものと考えられる。

これに対し、ピペット内液 EGTA 濃度を 0.1 mM と

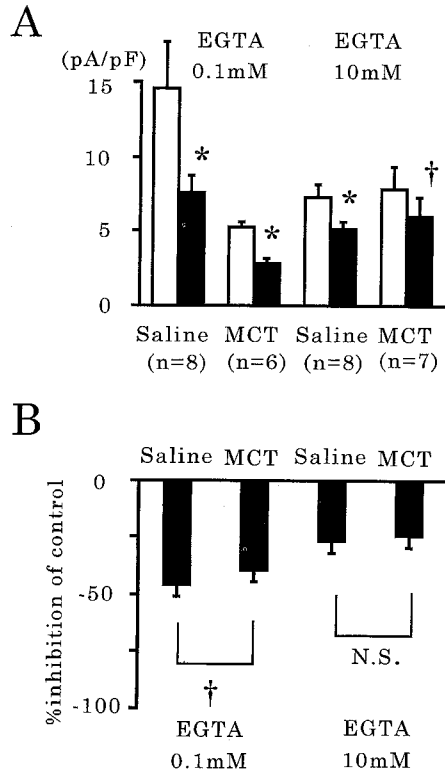


Fig. 9 Comparison of the inhibitory effect of TEA on outward currents. A: Outward pulse end current densities elicited by depolarization to +27 mV before (□) and after (■) application of 5 mM TEA were compared between Saline and MCT, at each EGTA concentration. Outward currents were significantly inhibited in both groups (* $P < .01$ or † $P < .05$). B: Mean inhibitory effects were also compared as % inhibition of control between Saline and MCT at each EGTA concentration. The effect of TEA was significantly smaller in MCT than in Saline at 0.1 mM EGTA († $P < .05$).

して、EGTA による細胞内 Ca^{2+} の緩衝作用を小さくしたことで見られた両群間の外向き電流量の差の著しい増大から、生理的条件下の PASMC では、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル電流が外向き電流系に大きく寄与しているとともに、MCT 群ではその著明な減少が起こっていることが示唆された。また、nisoldipine と TEA による外向き電流の抑制効果が MCT 群で有意に小さかったことは、同様に $I_{K,Ca}$ の減少を支持する結果である。本実験において用いた TEA は低濃度 (<5 mM) では選択的 K_{Ca} 抑制薬であるが¹³⁾、EGTA 10 mM 条件で抑制効果に有意差が認められなかったことから、他の K^+

チャンネルにも抑制効果を及ぼしたために、純粋な K_{Ca} 成分を検出できなかった可能性もある。しかし、EGTA 0.1 mM 条件での検討を加えることにより、効果の差を見出すことが可能であった。 $I_{K,ca}$ は細胞内 Ca^{2+} の濃度に依存して活性化され、外向き K^+ 電流を流すことにより膜電位の再分極に働いていると考えられており³¹⁾、血管の緊張性を規定する大きな役割を担っていると報告されている^{32,33)}。また、正常肺動脈に関し、肺内において局所血流をより換気状態の良い方向へ導くための内在機構として、低酸素性肺動脈収縮 (HPV) が報告されており、PASMC を用いたいくつかの検討から、HPV には低酸素による $I_{K,DR}$ あるいは $I_{K,ca}$ の減少が、それに引き続く細胞静止膜電位の脱分極、結果として細胞内への Ca^{2+} 流入をもたらすために生ずると考えられている^{29,30,34-37)}。こうした一過性の低酸素に対する反応は可逆的であり、慢性的な PH 病態を直接説明し得るものではないが、PH における肺動脈圧の持続的上昇と、PH crisis に代表される肺血管系の反応性亢進に、本実験で観察された $I_{K,ca}$ の減少が関連している可能性がある。しかし、 $I_{K,ca}$ の減少が PH 病態における細胞内 Ca^{2+} 上昇の直接的原因とは考えにくい。何故なら、本実験において、 Ca^{2+} 電流は PH 病態下に減少しており、 $I_{K,ca}$ を活性化し得る細胞内 Ca^{2+} 変動はむしろ低下していると推測されるからである。

Ca^{2+} 電流に関しては、PH 病態との関連を考えた場合、血管緊張性と反応性が亢進していることからすると、細胞内への Ca^{2+} 流入経路である Ca^{2+} チャンネル電流の増加が起こっていることが予想されたが、逆に L 型 Ca^{2+} 電流の減少が観察された。また、本実験で観察された Ca^{2+} 電流は nisoldipine (1 μ M) で完全に抑制されたことから L 型 Ca^{2+} 電流のみであると考えられ、PASMC には SHR の培養奇静脈で報告されている様な²⁰⁾、T 型 Ca^{2+} チャンネル電流は存在しないと考えられた。 Ca^{2+} 電流の減少は、細胞内への Ca^{2+} 流入の減少を意味し、PH 病態には矛盾する結果である。PH では肺動脈の緊張性が亢進していると考えられることから、PASMC で細胞内 Ca^{2+} 濃度が慢性的に高まっていると容易に想像される。実際、本態性高血圧症病態下の動脈平滑筋での Ca^{2+} 蛍光色素法を用いた検討では SHR の大動脈平滑筋において正常群に比較して細胞内 Ca^{2+} 濃度が高まっているとの報告がある³⁸⁻⁴⁰⁾。従って、PH 病態下の PASMC では、細胞内の Ca^{2+} 貯蔵部位である筋小胞体からの Ca^{2+} 漏出等の他の要因が、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を来す原因になっていると推測される。つまり、 Ca^{2+} 電流の減少は細胞内 Ca^{2+} 濃度が慢性的

に高まっている結果、 Ca^{2+} チャンネルの抑制性変化が起こったことによる、2 次的減少であると考察される。さらには、本実験で観察された $I_{K,ca}$ の減少は、 $I_{K,ca}$ の活性化を惹起する Ca^{2+} チャンネル電流が減少したことにより、招来したものととも考えられる。従って、血管緊張性増大の直接的原因は、むしろ細胞内 Ca^{2+} ホメオスターシスの変調にあって、イオンチャンネルがその影響を受けた結果、膜イオン電流に変化が生じたと推測される。ただし、これらの膜イオン電流の変化が PH 病態に更なる修飾をかける可能性はある。

本実験により、肺高血圧症ラットの PASMC において、膜イオン電流系の変化が示されたが、外向き電流における $I_{K,DR}$ と $I_{K,ca}$ の寄与の程度は、肺動脈の中核から末梢までの部位、あるいは血管径によって異なると報告されていることや¹³⁾、PH の病期に応じた細胞機能の変化が経時的に起こる可能性もあり、PH 病態との明確な関連性を説明するためには、今後の更なる検討が必要である。

5 要 約

Monocrotaline (MCT) 誘発肺高血圧症ラット及び正常肺動脈圧ラットの肺動脈平滑筋細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、膜イオン電流に関する両群間の比較を行った。

肺高血圧症ラットの肺動脈平滑筋細胞においては、以下の二種類の電流成分の変化が認められた。

1. Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネル (K_{Ca}) 電流の減少
2. Dihydropyridine 感受性 Ca^{2+} チャンネル電流の減少

以上の結果の考察に当たり、肺高血圧症において認められる肺動脈圧の持続的上昇と、血管反応性亢進に関して、膜イオン電流の変化は直接的原因にはならないと考えられる。むしろ、細胞内 Ca^{2+} 緩衝機構の異常が、2 次的に K_{Ca} ならびに Ca^{2+} チャンネルの機能に修飾を与えたと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に御指導、御鞭撻を賜りました札幌医科大学医学部生理学第一講座教室員各位、並びに外科学第二講座安倍十三夫教授に深く感謝申し上げます。

参考文献

1. Bando K, Turrentine MW, Sharp TG, Sekine Y, Aufiero TX, Sun K, Sekin E, Brown JW. Pulmonary hypertension after operations for con-

- genital heart disease: analysis of risk factors and management. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1996, 112: 1600-1609.
2. Morgan JM, Griffiths M, du BRM, Evans TW. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in systemic sclerosis and primary pulmonary hypertension. *Chest* 1991, 99: 551-556.
 3. Schindler MB, Bohn DJ, Bryan AC, Cutz E, Rabinovitch M. Increased respiratory system resistance and bronchial smooth muscle hypertrophy in children with acute postoperative pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 152: 1347-1352.
 4. Wheller J, George BL, Mulder DG, Jarmakani JM. Diagnosis and management of postoperative pulmonary hypertensive crisis. *Circulation* 1979, 60: 1640-1644.
 5. Rabinovitch M, Haworth SG, Castaneda AR, Nadas AS, Reid LM. Lung biopsy in congenital heart disease: a morphometric approach to pulmonary vascular disease. *Circulation* 1978, 58: 1107-1122.
 6. Rabinovitch M, Keane JF, Norwood WI, Castaneda AR, Reid L. Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary vascular findings after repair of congenital heart defects. *Circulation* 1984, 69: 655-667.
 7. Hall SM, Haworth SG. Onset and evolution of pulmonary vascular disease in young children: abnormal postnatal remodeling studied in lung biopsies. *J Pathol* 1991, 166: 183-193.
 8. Hosoda Y. Pathology of pulmonary hypertension: a human and experimental study. *Pathol Int* 1994, 44: 241-267.
 9. Allen SW, Chatfield BA, Koppenhafer SA, Schaffer MS, Wolfe RR, Abman SH. Circulating immunoreactive endothelin-1 in children with pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148: 519-522.
 10. Miyauti T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguti I, Sugishita Y, Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 1993, 73: 887-897.
 11. Hilliker KS, Roth RA. Increased vascular responsiveness in lungs of rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline pyrrole. *Am Rev Respir Dis* 1985, 131: 46-50.
 12. Smirnov SV, Robertson TP, Ward JPT, Aaronson PI. Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K^+ current in rat pulmonary artery muscle cells. *Am J Physiol* 1994, 266: H365-H370.
 13. Archer SL, Huang JM-C, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, Weir EK. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 1996, 78: 431-442.
 14. Yuan X-J. Voltage-gated K^+ currents regulate resting membrane potential and $(Ca^{2+})_i$ in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 1995, 77: 370-378.
 15. Clapp LH, Davey R, Gurney AM. ATP-sensitive K^+ channels mediate vasodilation produced by lemakalim in rabbit pulmonary artery. *Am J Physiol* 1993, 264: H1907-H1915.
 16. Lee SH, Earm YE. Caffeine induces periodic oscillations of Ca^{2+} -activated K^+ current in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 1994, 426: 189-198.
 17. Clapp LH, Turner JL, Kozlowski RZ. Ca^{2+} -activated Cl^- currents in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1996, 270: H1577-H1584.
 18. Anderson DE, Yuan X-J, Tseng C-M, Rubin LJ, Rosen GM, Tod ML. Nitro spin-traps block calcium channels and induce pulmonary artery relaxation independent of free radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 193: 878-885.
 19. Weir EK, Wyatt CN, Reeve HL, Huang J, Archer SL, Peers C. Diphenylethylidonium inhibits both potassium and calcium currents in isolated pulmonary artery smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 1994, 76(6): 2611-2615.
 20. Rusch NJ, Hermsmeyer K. Calcium currents are altered in the vascular muscle cell membrane of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1988, 63: 997-1002.
 21. Hilliker KS, Bell TG, Roth RA. Pneumotoxicity and thrombocytopenia after single injection of monocrotaline. *Am J Physiol* 1982, 242: H537-H579.
 22. Ghodsi F, Will JA. Changes in pulmonary structure and function induced by monocrotaline intoxication. *Am J Physiol* 1981, 240: H149-H155.
 23. Suzuki H, Twarog BM. Membrane properties of smooth muscle cells in pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol* 1982, 242: H907-H915.

24. Reindel JF, Roth RA. The effects of monocrotaline pyrrole on cultured bovine pulmonary artery endothelial and smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1990, 138: 707-719.
25. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of *Crotalaria* pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980, 239: H692-H702.
26. Meyrick BO, Reid LM. *Crotalaria*-induced pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1982, 106: 84-94.
27. Oike M, Kitamura K, Kuriyama H. Histamine H_3 -receptor activation augments voltage-dependent Ca^{2+} current via GTP hydrolysis in rabbit saphenous artery. *J Physiol* 1992, 448: 133-152.
28. Archer SL, Huang JM-C, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 7583-7587.
29. Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1992, 262: C882-C890.
30. Post JM, Gelband CH, Hume JR. $(Ca^{2+})_i$ inhibition of K^+ channels in canine pulmonary artery. *Circ Res* 1995, 77: 131-139.
31. Tohse N, Kanno M. Calcium regulation of ion channels in cardiomyocytes. In: Sperelakis N. *Physiology and pathophysiology of the heart*, third edition. Norwell, Kluwer Academic Publishers, 1995, 115-123.
32. Nelson MT, Cheng H, Rubart M, Santana F, Bonev AD, Knot HJ, Lederer WJ. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 1995, 270: 633-637.
33. Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science* 1992, 256: 532-535.
34. Cornfield DN, Reeve HL, Tolarova S, Weir EK, Archer S. Oxygen causes fetal pulmonary vasodilation through activation of a calcium-dependent potassium channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 8089-8094.
35. Cornfield DN, Stevens T, McMurtry IF, Abman SH, Rodman DM. Acute hypoxia causes membrane depolarization and calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1994, 266: L469-L475.
36. Yuan X-J, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxic and metabolic regulation of voltage-gated K^+ channels in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Exp Physiol* 1995, 80: 803-813.
37. Yuan X-J, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993, 264: L116-L123.
38. Sasaki F, Osugi S, Shimamura K, Sunano S. Relationship between blood pressure and smooth muscle tone in aortae of hypertensive rats: roles of $(Ca^{2+})_i$. *J Smooth Muscle Res* 1993, 29: 69-79.
39. Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Urabe H, Tsukakoshi M, Kasuya T, Yazaki Y. The elevation of the cytoplasmic calcium ions in vascular smooth muscle cells in SHR--Measurement of the free calcium ions in single living cells by laser microfluorespectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, 141: 340-345.
40. Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1990, 8: 369-375.

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部外科学第2講座 村木里誌