

シリーズ「細胞内 Ca イオン濃度の光学的測定法」

組織における細胞内 Ca イオン濃度測定

—平滑筋収縮との同時測定を中心に—

唐 木 英 明

(東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室)

I はじめに

各種の細胞において Ca は細胞内情報伝達の重要な役割を担う。細胞内遊離 Ca 量 ($[Ca]_i$) の経時的な測定はその機構を理解するうえで重要な手段である。組織を用いた細胞内遊離 Ca 量の測定は、その組織が持つ収縮、分泌などの機能と同時に測定することができ、これらの関連を知るうえで特に有用である。

平滑筋を例にとると⁴⁾、図 1 に示すように、細胞外 Ca 濃度約 $2000 \mu M$ に比べて細胞内の総 Ca 量は約 $200 \mu M$ である。しかし、細胞内 Ca のほとんどが小胞体、ミトコンドリアなどの細胞内小器官や各種の Ca 結合蛋白に結合し、わずかに数百分の 1 が遊離 Ca である。従って、細胞内遊離 Ca 量は細胞外の Ca 濃度に比

べて 1 万分の 1 程度しかない。細胞内遊離 Ca 量の正確な測定は、細胞内外の多量の Ca とどのように区別できるかにかかっている。例えば放射性 Ca を使った $[Ca]_i$ の測定法は、ランタン法が開発されるまでは細胞外 Ca の妨害を排除することができなかった。ランタンイオン (La) は膜表面の Ca 結合部位に強く結合し、この部位に結合していた Ca と置きかわる。また、La はチャネルからの Ca 流入を止める。他方、低温では Ca ポンプ活性が低下し、細胞内 Ca の排出が止る。これらの作用を利用して、放射性 Ca を取り込ませた組織を低温の La 液で洗浄すると、細胞外の遊離および結合 Ca をほぼ完全に除去できる。しかも低温 La 洗浄中に細胞内から Ca は流出しない。この画期的な方法を用いて細胞内の Ca 濃度が約 $200 \mu M$ であることが明らかにされた。しかしこの濃度は情報伝達機能を担う量としては多すぎ、そのほとんどが結合しているものと考えられる。また、平滑筋に高濃度 K で脱分極刺激を与えると細胞内 Ca 濃度は倍以上に増加するが、ノルエピネフリンで刺激したときにはほとんど増加が見られず、脱分極時にノルエピネフリンを投与すると、相加的な Ca の増加が起こる。そしてこの増加はミトコンドリアの Ca 取り込み機能の抑制により消失する。このように、La 法で測定される Ca は細胞内 Ca の総量であり、細胞内遊離 Ca 量を測定することはできない。また、収縮機能との同時測定はできない。しかし、Ca が細胞外から流入したものであるかどうかを知るためには有用な方法である。

蛍光 Ca 指示薬は細胞内に取り込まれ、遊離 Ca とだけ反応するので、細胞内遊離 Ca 量を

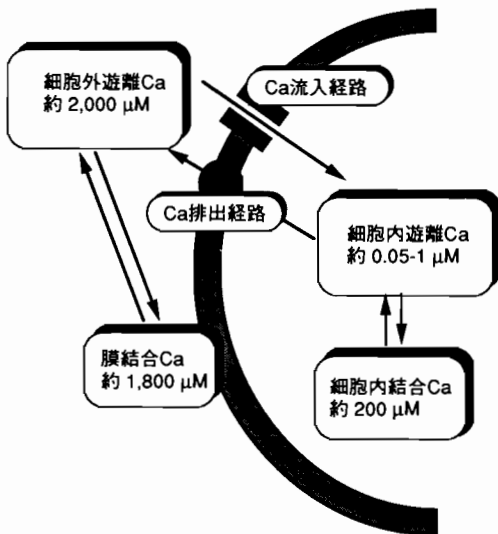


Fig. 1. Distribution of extracellular and intracellular Ca in smooth muscle.

測定できる。さらに、実験方法は比較的容易であり、時間分解能がよく収縮との同時測定が可能であるなどの利点があるが、Ca の動きを知ることは難しい。ここでは組織における蛍光指示薬を用いた細胞内 Ca イオン濃度測定の方法について、平滑筋収縮との同時測定を中心に述べる。

II 細胞内 Ca イオン濃度と平滑筋収縮との同時測定法

蛍光 Ca 指示薬には多くの種類があるが、ここでは fura-2 を用いる方法を中心に述べる⁹⁾。

A Fura-2 液の作り方と組織への取り込ませ方

Fura-2 法の成功のポイントは 2 つしかない。その第 1 は、良い標本を作ることである。平滑筋の取り扱いに十分に慣れて、確実に収縮の測定ができる標本を作ることが必要である。一本標本の例えば半分が損傷を受けていても、残りの半分が無傷であれば収縮は測定できる。しかし、fura-2 蛍光は標本の表面の一部の細胞から得るために、その部分の細胞が無傷でなければならない。組織は多くの細胞の集まりである。例えば血管標本には血管内皮、神経、結合組織など多くの細胞が含まれる。このうち血管内皮は多量の fura-2 を取り込み、その細胞内 Ca 量は種々の刺激により変化する。従って平滑筋の細胞内 Ca 量を測定したければ内皮は除去しなくてはならない。逆に、内皮の細胞内 Ca 量を測定することもできる。

第 2 は fura-2 液の作り方である。実験がうまく行かない理由の大部分は fura-2 液の作り方が良くないためである。Fura-2 は細胞膜を通過できないが、アセトキシメチル体 (fura-2/AM) にすると脂溶性を増して膜を通過するようになる。細胞に入るとエステラーゼの働きでアセトキシメチル基が離れて膜透過性を失い、細胞内に溜る。従って、組織を fura-2/AM 液に浸けておくことにより fura-2 が細胞内に溜まる。ところが fura-2/AM の栄養液への溶解度は低く、そのほとんどが容器の壁に付

着してしまう。そこで界面活性剤を用いて fura-2/AM の細かい粒子を溶液中に分散させる。しかしこの方法を使っても数 μM 以上を溶かすことは難しい。現在我々の用いている方法は以下の通りである。

(1) fura-2/AM の DMSO 溶液 (1 mM) 50 μl を界面活性剤 Cremophor EL 10% 溶液 20 μl と混和する。水溶液中で fura-2/AM は分解されるので、これから先の状態で保存してはいけない。

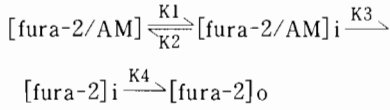
(2) ここに栄養液 10 ml を加え、fura-2/AM を 5 μM 、Cremophor EL を 0.02% とし、攪拌する。

(3) この液を超音波処理をする。超音波発生装置は細胞破碎用の強力なものが必要であり、超音波洗浄装置程度のもものでは不十分である。超音波処理中に fura-2 溶液が発熱しないように、水で冷やしながら数秒間超音波をかけ、少し休んで再び数秒間超音波をかける作業を数回から 10 回程度行う。

(4) こうして作った fura-2/AM 溶液がうまくできたかどうかは次のようにして調べる²⁾。通常 fura-2/AM は直径 2 μM 程度の粒子として溶液中に浮遊する。このような大きな粒子は組織の細胞間隙に進入できないために、組織は fura-2/AM を取り込むことができない。ただし、浮遊細胞系では細胞と粒子が接触できるので、比較的大きな粒子の溶液でも fura-2/AM を取り込むことができる。超音波処理により粒子は非常に小さくなり、組織の細胞間隙に入り込む。粒子の大きさは、遠沈で調べる。まず、溶液の蛍光強度を蛍光光度計で測定する。励起光は 340~380 nm とし、500 nm 蛍光を測定する。この溶液を 50,000 $\times\text{g}$ 20 分遠沈し、上清の蛍光強度を再び測定する。遠沈による蛍光強度の減少がほとんどない (20% 以内) であれば、溶液は使用できる。遠沈により蛍光強度が大きく減少したものは粒子の大きさが大きいことを意味し、組織では使えない。

(5) fura-2/AM 溶液中で平滑筋組織を 3~6 時間、暗所で処理する。fura-2/AM は細胞

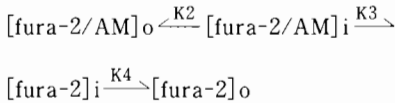
に取り込まれ fura-2 に変わる. 取り込みの間の fura-2 の動きは次のように考えられる⁶⁾.



ただし [] は濃度, o は細胞外, i は細胞内を表す.

室温あるいは低温では fura-2 の蓄積が良いが, これは漏出 (k4) が抑制されるためと考えられる. 一般に血管平滑筋は fura-2 を負荷し易いが, ウサギ大動脈, モルモット盲腸紐など取り込みが比較的良好な筋では長時間の処理が必要である. これは fura-2/AM の取り込み (K1) が悪いか, あるいはエステラーゼの作用 (K3) が弱いためと考えられる. 子宮, 消化管, 気管などほとんどすべての平滑筋組織で実験が可能である.

(6) 組織を蛍光測定装置に取付け, 収縮張力を記録しつつ, 栄養液で15~30分間筋を洗浄する. この間の fura-2 の動きは次のように考えられる.



最初の15~20分に細胞内外の fura-2/AM が流出する (k2). 同時にエステラーゼにより fura-2/AM は fura-2 にかわる (k3). 従って, fura-2/AM は急速に消失する. 細胞内の fura-2 もまたゆっくり流出する (k4). いくつかの平滑筋標本での fura-2/AM と fura-2 の濃度変化を図2に示す. 標本により fura-2/AM の流出速度 (k2) はほぼ一定であるが, fura-2 の流出速度 (k4) は違い, これが遅い標本では長い間実験ができる. fura-2 の流出は陰イオン輸送機構が関与するらしく, プロベネシドや低温でこの機構を抑制すると流出は遅くなる. しかし, プロベネシドも低温も収縮に大きな影響を

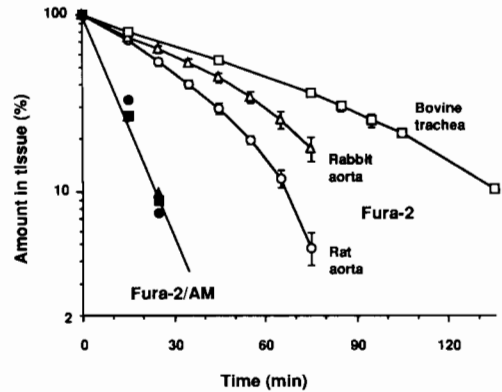


Fig. 2. Leakage of fura-2/AM and fura-2 from smooth muscle tissues. From Mitsui et al.(1993).

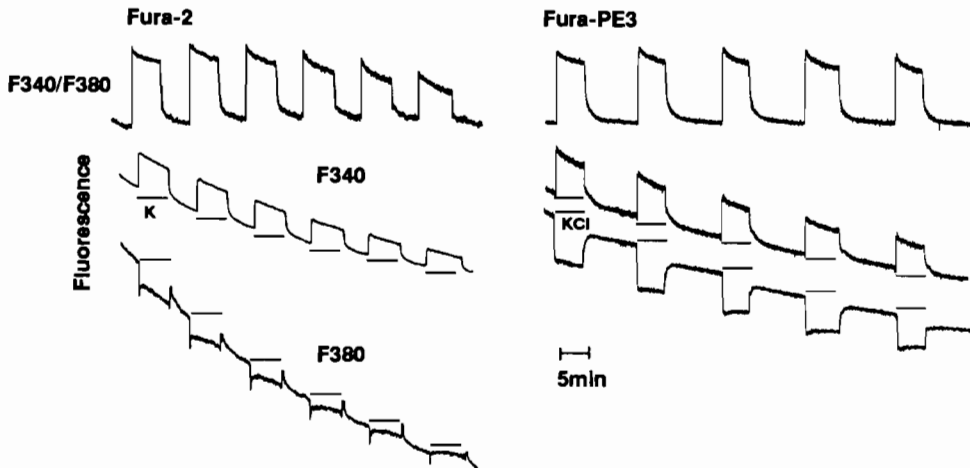


Fig. 3. Changes in F340, F340/F380 ratio and contractile tension stimulated with high K in the aorta loaded with fura-2 (left) or fura-PE3 (right).

与えるので、収縮との同時測定実験には使えない。最近発売された fura-2/PE3 は fura-2 と類似の構造を持ち、その蛍光特性は fura-2 とほとんど変わらないが、図3に示すように漏出が極めて遅いので、長時間の実験に適する。

後に述べるように、組織は種々の蛍光物質を含み、あるものは収縮刺激により変化する。fura-2 蛍光が十分に強いときにはこのような内因性の蛍光(自家蛍光)は無視できるが、fura-2 の漏出によりその濃度が低下すると、自家蛍光の影響が無視できなくなり、実験は不正確になる。

蛍光を持つ薬物や指示薬の蛍光を変化させる薬物は多い。特に濃度が高くなると影響がでる場合が多い。蛍光光度計で予めこのような影響がないことを確認する。

B 測定装置

測定装置は指示薬を励起するためのキセノンランプやレーザーなど励起波長発生源と、指示薬の蛍光を検出する装置から成る(図4)。収縮と細胞内遊離 Ca 量の同時測定には蛍光光度計型あるいは顕微鏡型を用いる。蛍光光度計型は組織の比較的広い面積の細胞内遊離 Ca 量を測定するので、顕微鏡型に比べて収縮を測定する部分との対応がよい。一台の機械を各種の測定

に兼用することはアタッチメントの付替、浴槽の交換などの点で不自由が多い。収縮と細胞内遊離 Ca 量との同時測定には測定機に組織用の浴槽を取り付ける。浴槽には縦置き型と横置き型とがあるが、組織の蛍光を測定するための横置き型(図4)が便利である⁹⁾。恒温槽の底部(石英ガラス面)にシリコンのゴム板を敷き、この上に標本をのせ一端をピンで固定する。収縮時に蛍光を測定する部分が動くと、蛍光の測定に誤差が加わるので注意する。標本の他端を張力トランスジューサーに連結し、収縮張力を記録する。励起光および組織からの蛍光は石英ガラスとシリコン板の穴を通過する。fura-2 の場合励起には 340 nm と 380 nm の2波長を使い、蛍光測定には 500 nm を使う。図4に示す装置では回転板に 340 nm と 380 nm のフィルターが取り付けられ、毎秒数十回波長を変える。励起波長の切り替えが素早く行えるものは Ca 測定の時間分解能がよい。組織の fura-2 は 500 nm 蛍光を発生し、これを測定する。340 nm 励起による 500 nm 蛍光(F 340)、380 nm 励起による 500 nm 蛍光(F 380)、そして F 340 と F 380 の比(F 340/F 380)を記録する。

C 測定結果の解析

図5にラット大動脈における実験例を示す。

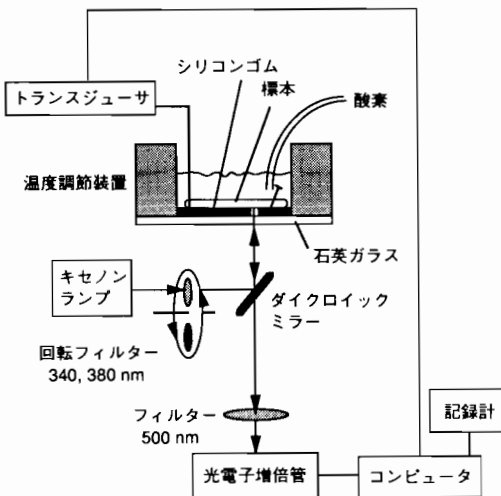


Fig. 4. Equipment for measuring fura-2/Ca signal and muscle contraction simultaneously.

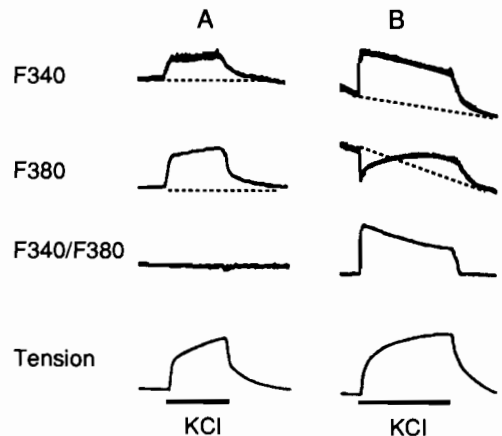


Fig. 5. Changes in F 340, F 380, F 340/F 380 ratio and muscle tension in the rat aorta stimulated with high K. A: without fura-2-loading. B: with insufficient fura-2-loading.

A に fura-2 を負荷していない組織の蛍光変化を示す。標本の結合組織などは一定の自家蛍光を発するため、fura-2 を負荷しない場合にも蛍光が測定できる。高濃度 K 収縮時に F 340 および F 380 はともに増加する。これは細胞内のピリジヌクレオチドやフラビン蛋白等の蛍光物質が収縮と対応した変化を示すためである⁸⁾。この例では F 340 と F 380 が比例して増加したので蛍光比は変化しない。しかし、他の標本では蛍光比が変化する場合もあり、蛍光比だけ見ていると Ca 量を測定しているものと錯覚することがある。しかし、Ca 蛍光であれば F 340 と F 380 が逆方向に動き、両者は鏡像関係になるはずである。また、自家蛍光の立ち上がりは収縮の立ち上がりより遅く、蛍光の減少は弛緩より遅い。さらに F 340 および F 380 の静止値の経時的な減少は見られないので、自家蛍光と fura-2 蛍光とは簡単に区別できる。自家蛍光は代謝のインディケータとして使えるが、次に述べるように fura-2 負荷が不十分な組織では fura-2 蛍光測定の妨げとなる。

B には、fura-2 負荷が不十分な場合の蛍光変化を示す。組織に fura-2 を取り込ませると蛍光強度は 2 ~ 3 倍に増加する。また静止時の蛍光強度は fura-2 の漏出により経時的に減少する。高濃度 K 収縮時に F 340 は増加し、その立ち上がり速度は速い。F 380 は収縮初期に減少し、F 340 と F 380 は鏡像関係になる。しかしすぐに F 380 は増加に転じ、そのために鏡像関係は崩れる。これは自家蛍光の増加により F 380 が次第に増加し、fura-2 による F 380 の減少に打ち勝つたためである。すなわち、F 380 を急速に減少させる fura-2-Ca 蛍光と、これに遅れて F 380 を増加させる自家蛍光が混在することを示す。他方、F 340 は Ca 蛍光と自家蛍光の両者の増加の和となり、大きな増加を示す。その結果、F 340/F 380 は一旦増加するが、分母 (F 380) が大きくなるためにそのレベルは徐々に低下し、あたかも Ca 濃度が一旦増加した後少しづつ元のレベルに戻ってゆくように見える。不適切な実験の例である。

Fura-2 を十分に取り込ませた標本での成績を図 3 に示す。このような標本に高濃度 K を適用すると F 340 は増加、F 380 は減少し、蛍光比は持続性に増加する。これらの変化は収縮に先行する。高濃度 K の洗浄により F 340 は減少、F 380 は増加し、蛍光比は減少する。この場合も、蛍光変化が弛緩に先行する。実験中に fura-2 の漏出により F 340 と F 380 は徐々に減少するが、両者の減少率はほぼ一定であるために、F 340/F 380 の比率は一定値を保つ。実験中常に F 340 と F 380 をモニターし、これが鏡像関係にあることを確認する。図 3 の fura-2 の例では F 340 の増加も F 380 の減少も徐々に小さくなり、図 5 B に似た結果になる。これは fura-2 の漏出によるその量が減少したために自家蛍光の影響がでてきたものである。この例では信頼できる測定成績は 2 回あるいは 3 回目の高濃度 K 添加までである。F 340 と F 380 が鏡像関係にあるかぎり、それぞれの絶対値が小さくなくてもその比は一定であるからである。他方、fura-PE3 を使えば、5 回目の高濃度 K 添加まで蛍光強度はほとんど変わらず、長期の実験が可能である。

D Ca 量の絶対値の求め方

Ca 量の絶対値は次のように計算できる。

$$[Ca]_i = \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \times Kd \times \beta \quad (1)$$

ただし、 $[Ca]_i$ は細胞内遊離 Ca 量、R は蛍光比 (F 340/F 380)、 R_{max} と R_{min} は十分量の Ca 存在下と Ca 不在下での R、 β は Ca 不在下での F 380 と Ca 存在下の F 380 の比である。この方法により fura-2 の漏出や動きの影響はほぼ修正され、Ca の計算値は影響を受けない。ただしこの式は fura-2 と fura-2-Ca の 2 種類の蛍光しか存在しないことを前提に成立つため、自家蛍光が存在する時には成立たない。さらに fura-2 は細胞内で蛋白質と結合し、その蛍光特性が変わるので、栄養液中で得られた R_{max} 、 R_{min} と細胞内での R との比較は無意味である。そこで細胞内で R_{max} 、 R_{min} を得る方法が考えられた。図 6 に示すように、実験の

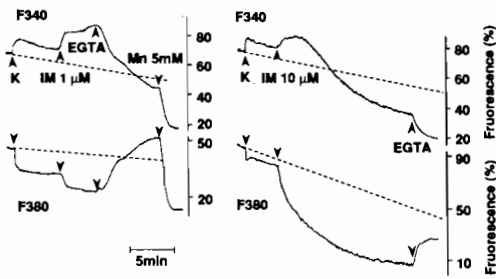


Fig. 6. The effects of ionomycin (IM) on F 340 and F 380 in the aorta loaded with fura-2. Modified from the figure by Mitsui et al. (1993).

最後に 10 mM Ca と Ca イオノフォアである 10 μ M イオノマイシンを含む高濃度 K 液を投与し、F 340 と F 380 の最大値を得る。その時の R を R_{max} とする。次に 2 mM EGTA と 10 μ M イオノマイシンを加えて F 340 と F 380 の最小値を得て、このときの R を R_{min} とし、 R_{min} と R_{max} 測定時の F 380 の比を β とする。さらに、fura-2 蛍光を消光する作用を持つ 5 mM Mn とイオノマイシンを加え、細胞内外の fura-2 蛍光を全て消し、残った fura-2 以外の蛍光量(自家蛍光)を知る。このとき EGTA は Mn をキレートするので除いておく。実験中に得られた F 340 と F 380 から自家蛍光を差し引いた上で R と β を計算して Ca 量を得る。自家蛍光を補正せずに計算すると収縮時の Ca 量の増加は時間と共に小さくなるように見えるが、自家蛍光を補正するとほぼ一定の増加であることがわかる。逆にこのような例では自家蛍光が無視できない大きさであることがわかる。

この方法で計算した Ca 濃度の精度は K_d および R_{max} と R_{min} の信頼性、すなわちイオノマイシンにより細胞膜の Ca 透過性が十分に増加しているかどうかによる。図 6 に示すように、高濃度(10 μ M 以上)のイオノマイシンは Ca の透過性は増すが、同時に fura-2 の漏出も増すので、余り長い時間イオノマイシンを投与すると蛍光量が減少してしまう。低濃度(1 μ M 程度)のイオノマイシンは Ca の透過性を十分に増すかどうか問題がある。さらに細胞内の環境により fura-2 の蛍光特性や Ca に対する K_d

値が変わり、正確な値が分らないので絶対値は計算できない^{3,5)}。従って Ca 量は相対値で表すべきであろう。相対値の表示法には(1)式の K_d を掛ける前の値、 R_{max} と R_{min} を基準とした R の相対値、そして静止時および刺激時の R を基準とした R の相対値等が考えられる。 R_{max} と R_{min} が正しければ、(1)式の K_d を掛ける前の値は、この値に正しい K_d を掛ければ直ちに正しい Ca 量が求められる。R については、装置によって励起光の強度、フィルターの透過度、高電子増倍管の感度が一定でないで、これらを補正する機能がある装置ではこの値を使えるが、それ以外の装置では求められた R の絶対値を比較することは意味がない。補正機能のない装置では、同じ装置でも違った時に得られた R の比較はできない。 R_{max} と R_{min} が正しければ、これを基準として R の相対値を比較すればこの様な問題は解決できるが、これらの正しい値を得ることが難しいことは既に述べた。また R と Ca の関係はシグモイドとなり、Ca の対数値と R とが疑似直線的に相関するのはシグモイドの中央部分だけである。従って R を Ca 量の相対値として使用できるのはその中央部分だけである。平滑筋では静止時の R と高濃度 K による刺激時の R はともに疑似直線部分に入っている。我々は簡便法として通常はこれらの値を基準にとり R の相対値を用いて比較を行っている。これを使えばあいまいな R_{max} と R_{min} と K_d を使わなくてもよい。この方法は同一の筋では有用であるが、静止時および高濃度 K 刺激時の R が異なった筋相互の比較ができない。

Ⅲ Fura-2 法の組織への応用の問題点

組織を用いて細胞内 Ca 量を測定する際には、測定される Ca 蛍光が多く細胞の蛍光の集積であることを考えておかななくてはならない。それぞれの細胞は必ずしも同一の変化をするとは限らない。また一つの細胞でも Ca の分布が一様であるとは限らない。

平滑筋において細胞内遊離 Ca 量と収縮の同

時に測定に成功したのは Morgan と Morgan によるエクオリンを用いた実験である⁷⁾。彼らの成績は fura-2 の成績とは多くの点で違っている。例えばフェニレフリンなどにより α 受容体を刺激すると持続性の収縮が得られ、このとき fura-2 で測定した Ca はほぼ収縮張力の変化に対応するが、エクオリンで測定した Ca は初期に大きな一過性の増加を示し、その後非常に小さな持続相を伴う。このような違いの原因は次のように考えられる。fura-2 は Ca と 1 対 1 の結合し、その蛍光量も Ca 濃度の一次関数で表される。これに対してエクオリンは Ca 濃度の 2.5 乗の光を発する。従って、Ca 量の単位変化当り、エクオリンは fura-2 の約 2.5 倍大きな変化を示す。もし細胞内 Ca の分布が一様でなく、高いところと低いところがあれば、エクオリン信号は fura-2 蛍光より大きくなる。このように、fura-2 で測定した Ca 量とエクオリンで測定した Ca 量に差があるのは細胞内 Ca の局在のためといえる³⁾。 α 受容体刺激直後の一過性の大きなエクオリン信号は、2 回目の刺激により非常に小さくなる。10 時間以上刺激を行わないと信号が回復することから、おそらく細胞膜と小胞体の間の小さな部分の Ca 濃度が一過性に非常に高くなり、ここに分布するエクオリンが急速に消費されるが、長い休止期間にこの部位にエクオリンが再分布すると考えられる¹⁾。Fura-2 により測定した Ca 量は収縮とほぼ対応するが、厳密に検討すると刺激の種類により Ca 量あたりの収縮高が違い、収縮蛋白質の Ca 感受性の変化が示唆されている。しかし、Ca 量と収縮がほとんど対応しない例も見られる。例えば、エンドセリンや ATP 投与直後の一過性の Ca 量の増加はほとんど収縮を起こさない。このときミオシンのリン酸化も起こらないので、細胞質のミオシン軽鎖キナーゼ周辺の Ca 量が増加しているとは考えられない。従って、fura-2 もある状況では局所的な Ca 量の増加を捕えると考えられる。このように、平滑筋細胞での Ca の分布が一様でない証拠が集まると、Ca 量の測定値の意味を考える必要がでて

くる。特に Ca 感受性の変化を議論する際にはスキンドファイバー標本での実験などの成績と併せて慎重に解釈しなくてはならない。

さらに細胞内遊離 Ca 量の変化は細胞外からの Ca の流入と細胞外への排出、小胞体などの細胞内小器官への Ca の取り込みと遊離などの要因によりもたらされるが、細胞内遊離 Ca 量の測定結果からその変化の要因を特定することは困難である。放射性 Ca を用いた Ca の動きの解析も重要である。Fura-2 法は細胞内 Ca の増減と細胞機能の相関を知るうえで有用な方法であるが、オールマイティーではない。他の多くの方法と併用した総合的な実験が望まれる。

文 献

- 1) Abe, F., Mitsui-Saito, M., Karaki, H. & Endo, M. Calcium compartments in vascular smooth muscle cells as detected by aequorin signal. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 3000-3004, 1995.
- 2) Abe, A. & Karaki, H. (1989) Effects of forskolin on cytosolic Ca^{2+} level and contraction in vascular smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**, 895-900
- 3) Karaki, H. (1989) Ca^{2+} localization and sensitivity in vascular smooth muscle. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**, 320-325
- 4) Karaki, H. & Weiss, G. B. (1979) Alterations in high and low affinity binding of ^{45}Ca in rabbit aortic smooth muscle by norepinephrine and potassium after exposure to lanthanum at low temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **211**, 86-92
- 5) Mitsui, M. & Karaki, H. (1990) Dual effects of carbachol on cytosolic Ca^{2+} and contraction in the intestinal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* **258**, C 787-C 763
- 6) Mitsui, M., Abe, A., Tajimi, M. & Karaki, H. (1993) Leakage of a fluorescent Ca^{2+} indicator, fura-2, in smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* **61**, 165-170
- 7) Morgan, J. P. & Morgan, K. G. (1984) Stimulus-specific patterns of intracellular calcium levels in smooth muscle of ferret portal vein. *J. Physiol.* **351**, 155-167
- 8) Ozaki, H., Satoh, T., Karaki, H. & Ishida, Y. (1988) Regulation of metabolism and contraction by cytoplasmic calcium in the intestinal smooth muscle. *J. Biol. Chem.* **263**, 14074-14079
- 9) Sato, K., Ozaki, H. & Karaki, H. (1988) Changes in cytosolic calcium level in vascular smooth muscle

- strips measured simultaneously with contraction using fluorescent calcium indicator fura 2. J. Pharmacol. Exp. Ther. **246**, 294-300
- 10) Sato, K., Ozaki, H. & Karaki, H. (1990) Differential effects of carbachol on cytosolic calcium levels in vascular endothelium and smooth muscle. J. Pharmacol. Exp. Ther. **255**, 114-119