

妊娠高血圧症の病態における細胞内 Ca^{2+} 動態と 液性因子の関与に関する研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室
(主任: 望月眞人教授)

高 島 正 樹, 森 川 肇, 山 崎 峰 夫, 望 月 眞 人

Cation Metabolism and the Effects of Circulating Factors in Pregnancy Induced Hypertension

Masaki TAKASHIMA, Hajime MORIKAWA,
Mineo YAMASAKI and Matsuto MOCHIZUKI

(Director: Prof. Matsuto Mochizuki)
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University, School of Medicine, Hyogo, Japan

In order to clarify the pathophysiological significance of changes in intracellular ionized calcium and sodium levels in pregnancy induced hypertension (PIH), the intracellular ionized calcium concentration in platelets ($\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$) and the intracellular ionized sodium concentration in red blood cells ($\text{r-}[\text{Na}^{+}]_{\text{i}}$) were measured simultaneously in PIH women in the third trimester. $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ in the first trimester showed a slightly greater increase than in the women of normal luteal phase. In the second trimester, $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ decreased significantly compared to first trimester, and the third trimester and first trimester levels were the same. In women with mild and severe PIH, the levels in both groups were significantly increased compared with that in normal pregnant women. Thus mechanisms not associated with platelet activation were considered as the cause of the increase of $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ of women with PIH. $\text{r-}[\text{Na}^{+}]_{\text{i}}$ in mild and severe PIH were also significantly increased compared to normal pregnancy. No correlation between $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ and $\text{r-}[\text{Na}^{+}]_{\text{i}}$ and diastolic blood pressure was observed in normal pregnancy, but a positive correlation was observed in PIH. When the male platelets were incubated with serum from non-pregnant or normal pregnant women, $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ did not show any significant changes. On the other hand, $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ was significantly increased after the incubation with serum from PIH women. Moreover, $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ was significantly increased after the incubation with 17β -estradiol, parathyroid hormone (PTH), or endothelin-1 (ET-1). These data suggest that the increase of $\text{p-}[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ and $\text{r-}[\text{Na}^{+}]_{\text{i}}$ in PIH is important in the initiation and maintenance of hypertension by influencing peripheral vascular resistance, and also various factors in the serum of PIH women may contribute to the accumulation of intracellular ionized calcium in patients with PIH.

Key words : pregnancy induced hypertension, intracellular ionized calcium concentration, intracellular ionized sodium concentration, hormonal factors

緒 言

妊娠高血圧症 (pregnancy induced hypertension:PIH) の発症メカニズムについては、多くの研究が繰り返されてきたにもかかわらず、いまなお不明のままである。三村ら¹⁾は、細胞膜 Na^+ -pump と細胞内 Na^+ 濃度を測定し、細動脈平滑筋細胞内 Na^+ 濃度の上昇が末梢血管抵抗の上昇と密接な関係にあることから、細胞内 Na^+ 濃度の上昇が細胞膜 Na^+ - Ca^{2+} 交換機構を介して細胞内 Ca^{2+} の増加を惹起し、細動脈平滑筋細胞の収縮性を高め、その結果血圧の上昇を助長している可能性を指摘した。一方、 Ca 摂取の少ない地方では子癇の発症が高率であり²⁾、しかも PIH 妊婦では末梢血管抵抗が増大していることも知られている³⁾⁴⁾⁵⁾。このように Ca 摂取量の多寡が高血圧発症と密接な関係にあり⁶⁾、妊婦における calcium homeostasis の異常が PIH を発症させる成因の一つとなっていることを十分に推察させる。

そこで本研究では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態を実際に測定し、PIH という病態成立における細胞内 Ca^{2+} の意義を細胞内 Na^+ 濃度の動態と比較検討するとともに、その病態成立のメカニズム解明を目的として液性因子が関与していることを内分泌学的手法をもって解析した。

研究対象と方法

I. 研究対象

対象は正常男子15例、正常非妊婦30例 (卵胞期15例、黄体期15例)、正常妊婦52例、妊娠末期 (妊娠34週～38週) で正常食で未治療 (無処置) の純粋型軽症妊娠高血圧症 (PIH) 妊婦9例および純粋型重症 PIH 妊婦10例である。尚、PIH 妊婦は日本産科婦人科学会妊娠中毒症問題委員会が1984年6月に提案した妊娠中毒症の定義と分類基準⁷⁾に従って、高血圧を主徴候とする純粋型妊娠中毒症を軽症と重症に分類した。

II. 研究方法

1. 血圧の測定および血液の採取

正常男子、正常非妊婦、正常妊婦、あるいは PIH 妊婦を15分間安静臥床させた後、血圧を ACOMA 水銀血圧計にて測定した。

血液は三種類の方法で採取した。血小板内 Ca^{2+} 濃度測定、血小板 population の評価および血小板の thrombin に対する反応性に関する検討のためには3.8% (w/v) クエン酸採血とし (クエン酸と血液は1対9の割合で混合)、一方赤血球内 Na^+ 濃度の測定にはヘパリン採血とした。血液の採取にあたっては、陰圧をかけないようにして採血し、最初の5ml は使用しなかった。これらの血液は直ちに血小板内 Ca^{2+} 濃度および赤血球内 Na^+ 濃度の測定および血小板機能検査に供した。一方、血小板第4因子 (platelet factor-4; PF-4)、 β -thromboglobulin (β -TG) 測定には普通採血とした。普通採血で得られた検体は、血清を分離後、測定まで -20°C にて凍結保存した。

2. 血小板 population に関する検討

後述の方法により得られた洗浄血小板浮遊液を用い、血小板 population を評価するために、平

均血小板容積 (mean platelet volume:MPV) を東亜医用電子自動血球計算器 F-8000 を用いて測定した。

3. 血小板の thrombin に対する反応性に関する検討

正常妊娠末期妊婦10名より得られた血小板浮遊液1.5ml に最終濃度0.01, 0.05, 0.1, 0.5あるいは1.0iu/ml の thrombin を添加して凝集曲線を作成し, 50%の凝集率を示す thrombin 量である0.1iu/ml を thrombin の添加量とした。血小板の thrombin に対する反応性は, thrombin 添加前血小板内 Ca^{2+} 濃度に対する thrombin 添加後血小板 Ca^{2+} 濃度のピーク値の比により比較検討した。

4. 血小板第4因子および β -thromboglobulin の測定

血小板活性化の評価として, 活性化とともに特殊顆粒から放出される血小板第4因子 (PF-4) と β -thromboglobulin (β -TG) を RIA により測定した。

5. 赤血球内 Na^+ 濃度の測定

赤血球内 Na^+ 濃度は萱ら⁸⁾のヘマトクリット毛細管法により測定した。ヘパリン採血後1500×g, 5分間遠心し分離した赤血球成分60 μ l をマイクロピペットを用いてヘマトクリット毛細管に注入し, 室温にて30000×g, 5分間遠心分離した。ヘマトクリット毛細管を赤血球側末端より75% (45 μ l) の長さで切断し, 3ml の Li^+ 溶液内で溶血させ日立炎光光度計775-A により測定した。尚, trapped plasma は3%として補正した。

6. 血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定

クエン酸採血で得られた検体20ml を30分間室温にて静置した後, 22℃で150×g, 10分間の遠心により platelet rich plasma (PRP) を作成した。この PRP に fura-2-acetoxymethyl ester (fura-2/AM) (同仁化学) を最終濃度3 μ M になるように添加し, 37℃, 30分間 incubation することにより fura-2 を血小板に負荷した。次に血小板の活性化を抑制するために prostacyclin を最終濃度1 μ M になるように添加した後, 22℃で800×g, 10分間遠心をおこない fura-2-loaded platelets を採取した。この pellet を modified Hepes-Tyrode's buffer (129mM NaCl, 2.8mM KCl, 0.8mM $\text{KH}_2\text{P O}_4$, 8.9mM NaHCO_3 , 0.8mM MgCl_2 , 10mM Hepes, 5.5mM glucose, pH7.2, 37℃) にて2回洗浄し, 最終的に 2.0×10^8 cells/ml になるように洗浄血小板浮遊液を調整し以下の実験に供した (Fig. 1)。

血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定には, 日立分光蛍光光度計 F-2000 を使用し, Grynkiewicz ら⁹⁾の報告に準じて励起波長340nm, 蛍光波長510nm, および励起波長380nm, 蛍光波長510nmの2波長における蛍光強度を測定した。すなわち, キュベットに洗浄血小板浮遊液1.5ml を入れ, 細胞外液の Ca^{2+} 濃度を100 μ M とし15分間 incubate した後, その時のそれぞれの蛍光強度の比を F (F(340)/F(380)), 0.1% Triton X-100 (Sigma, U.S.A) を15 μ l 添加した際の蛍光強度の比を Fmax (Fmax(340)/Fmax(380)), 3mM EGTA-Tris-buffer (pH8.5) を60 μ l 添加した際の蛍光強度を Fmin (Fmin(340)/Fmin(380)) とし, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は以下の式で求めた。尚, 今回の実験系における Kd 値は Grynkiewicz らの報告⁹⁾に従って224とした (Fig. 1)。

$$p-[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd} (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F) \quad (\text{Kd} = 224)$$

7. 血小板内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす正常非妊婦, 正常妊婦および妊娠高血圧症 (PIH) 妊婦から得られた血清の影響に関する検討

正常男子より得られた血液を用いて作成した洗浄血小板浮遊液1.5ml をキュベットに入れ, 細胞外液の Ca^{2+} 濃度を100 μ M とし15分間 incubation した。ついで卵胞期 (n=5) または黄体期 (n

=5), 純粋型軽症 PIH 妊婦 ($n=5$) あるいは純粋型重症 PIH 妊婦 ($n=6$) の血清 $30\mu\text{l}$ を添加し, 37°C , 15分間 incubation した際の血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定した。各血清の血小板内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす影響は血清非添加時に対する添加時の血小板内 Ca^{2+} 濃度の増加率として示した。

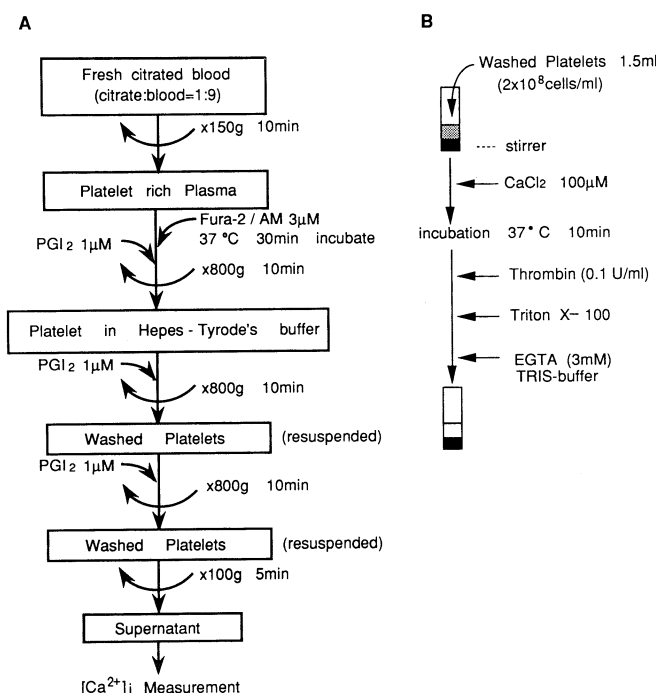


Fig. 1A: The method for preparation of fura-2-loaded platelets.
B: Measurement of intracellular ionized calcium in washed platelets.

8. 血小板内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすホルモンの影響に関する検討

正常男子より得られた洗浄血小板浮遊液 1.5ml をキュベットに入れ, 細胞外液の Ca^{2+} 濃度を $100\mu\text{M}$ とし15分間 incubation した後, 後述のホルモンをそれぞれ単独または混合して添加し血小板内 Ca^{2+} 濃度を測定した。各種ホルモンの影響は, まず同時に2本のキュベットを用意し, 一方はホルモン溶解用の溶液を, 他方にはホルモンを溶解した溶液を等量添加し, インキュベーション終了時のホルモン非添加時に対する添加時の血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化量を%表示した。また, steroid hormone の溶解は ethanol 2ml に溶解させた後, 前述の modified Hepes - Tyrode's buffer にて希釈し実験に供した。

使用したホルモンは 17β -estradiol (半井化学)を0, 1, 10あるいは 100ng/ml , progesterone (半井化学)を0, 1, 10あるいは 100ng/ml , endothelin-1 (大阪蛋白研)を0, 1, 10あるいは 100pg/ml , 1-34 parathyroid hormone (PTH: 大阪蛋白研)を0, 1, 10あるいは 100ng/ml , Insulin-like Growth Factor (IGF)-I (藤沢薬品)を0, 10, 100あるいは 1000ng/ml , IGF-II (Lilly Research Laboratories, T51-ZL7-92)を0, 10, 100あるいは 500ng/ml , dehydroepiandrosterone

sulfate (DHAS: カネボウ製薬) を0, 10, 100あるいは1000ng/ml, atrial natriuretic hormone (ANP: 大阪蛋白研) を0, 50, 100あるいは200pg/ml, prolactin (PRL: 大阪蛋白研) を0, 50, 100あるいは200ng/ml, human chorionic gonadotropin (hCG: 持田製薬) を0, 10^4 , 10^5 あるいは 10^6 IU/l, human placental lactogen (hPL-Kobe) を0, 2, 5あるいは $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度として, それぞれのホルモンを単独で洗浄血小板浮遊液に添加した。

また, 今回検討した各ホルモンの添加量の範囲内で, 最大の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化率を示した濃度を添加量とし, これらのホルモンを混合添加して incubation 実験を行った (17 β -estradiol 100 ng/ml, progesterone 100ng/ml, endothelin-1 100pg/ml, PTH 10ng/ml, IGF-I 100ng/ml, IGF-II 500ng/ml, DHAS 10ng/ml, DHA 100ng/ml, ANP 50ng/ml, PRL 100pg/ml, hCG 10^6 IU/l, および hPL $10 \mu\text{g/ml}$)。

一方, 重症 PIH 患者1例の血清30 μl を血小板浮遊液に添加し, 血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べるとともに, 同一 PIH 患者の血中の各ホルモン濃度を測定し, その濃度で各ホルモンを混合し, 血小板浮遊液に添加することによる血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化も比較検討した (17 β -estradiol 30ng/ml, progesterone 40ng/ml, endothelin-1 1.5pg/ml, PTH 1.0ng/ml, ANP 100ng/ml, PRL 100pg/ml, および hPL $6.0 \mu\text{g/ml}$)。

9. 統計学的処理

得られた成績の統計学的処理は Student's t-test によった。

研 究 成 績

1. 血小板 population に関する検討

洗浄血小板における mean platelet volume (MPV) 測定の成績を Fig. 2に示す。正常男子では 9.0 ± 0.8 (fl), 正常非妊婦では 9.2 ± 1.7 であった。正常妊娠初期妊婦は 8.5 ± 0.3 , 妊娠中期では 8.6 ± 1.1 , 妊娠末期では 8.8 ± 1.5 であった。また, 妊娠末期の純粹型軽症 PIH 妊婦では 8.6 ± 1.2 ,

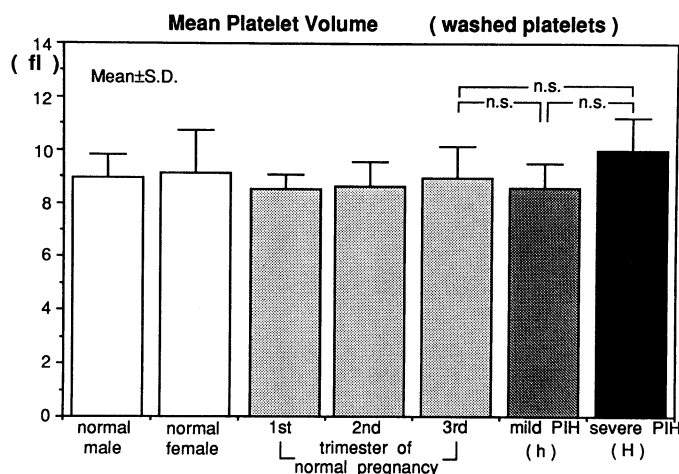


Fig. 2 Mean platelet volume (washed platelets) from normotensive men, normotensive women, normal pregnant and PIH women.
n.s.: not significant

重症 PIH 妊婦では 10.0 ± 1.6 と、正常妊娠末期妊婦と軽症および重症 PIH 妊婦の間に有意の差はなかった。

2. 血小板の thrombin に対する反応性に関する検討

洗浄血小板の thrombin に対する反応性については、正常妊婦と PIH 妊婦の間に有意の差はなかった。(Fig. 3)

3. 血小板第4因子および β -thromboglobulin の測定

PF-4, β -TG については、正常妊娠末期妊婦、軽症型 PIH 妊婦および重症型 PIH 妊婦の順に増加傾向を示すが、有意の差ではなかった (Fig. 4)。

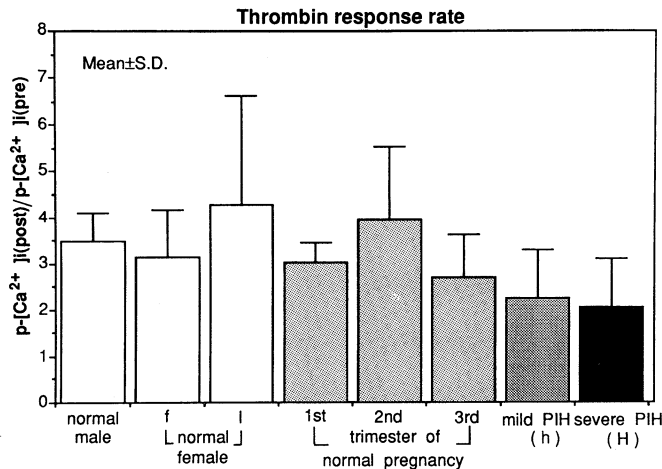


Fig. 3 Thrombin response in washed platelets from normotensive men, normotensive women, normal pregnant and PIH women. 'f' denotes follicular phase and 'l' denotes luteal phase. n.s.: not significant

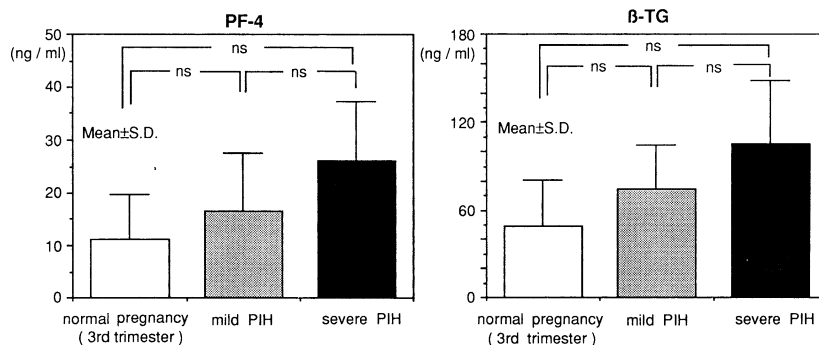


Fig. 4 Serum platelet factor-4 (PF-4) and β -thromboglobulin (β -TG) concentrations in normal pregnant women (3rd trimester), mild PIH(h) and severe PIH (H) women.

n.s.: not significant

4. 赤血球内 Na^+ 濃度の測定成績

正常非妊婦の赤血球内 Na^+ 濃度 ($\text{mEq/l} \cdot \text{cells}$) は卵胞期 12.0 ± 0.4 , 黄体期 10.7 ± 0.8 であった。正常妊娠初期妊婦の赤血球内 Na^+ 濃度は 10.4 ± 0.5 , 妊娠中期では 10.7 ± 0.8 , 妊娠末期では 11.5 ± 0.6 であった。また, 妊娠末期の純粋型軽症 PIH 妊婦では 12.7 ± 0.5 , 重症 PIH 妊婦では 12.9 ± 0.9 といずれも正常妊娠末期妊婦に比べ有意の高値 ($p < 0.01$) であった (Fig. 5)。

正常妊娠末期妊婦および PIH 妊婦における赤血球内 Na^+ 濃度と拡張期血圧の関係を Fig. 6 に示

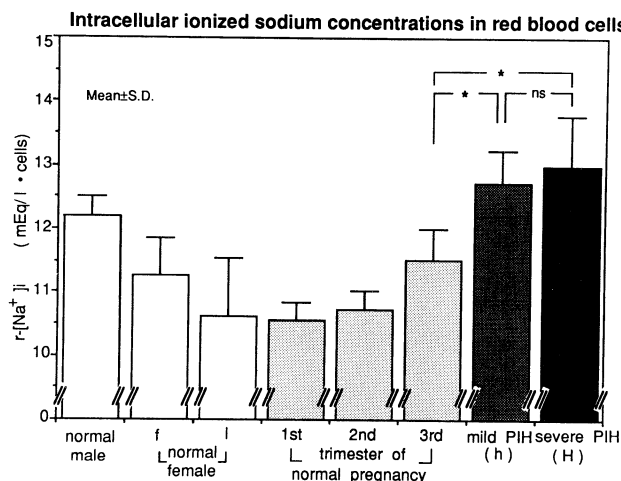


Fig. 5 Intracellular ionized sodium concentrations in red blood cells from normotensive men, normotensive women (follicular and luteal phase), normal pregnant and PIH women.

'f' denotes follicular phase and 'l' denotes luteal phase.

* $p < 0.01$ n.s.: not significant

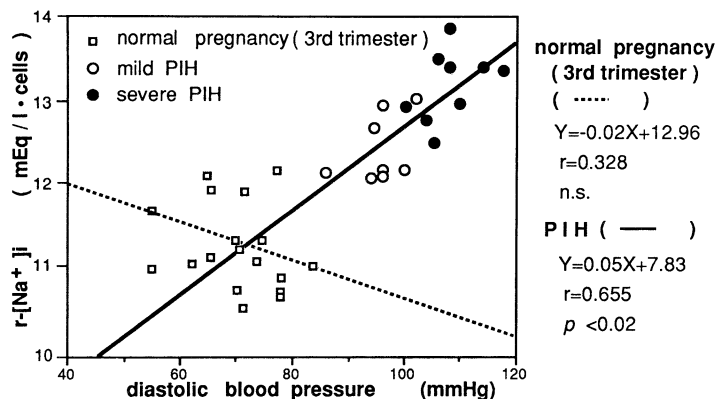


Fig. 6 Relationship between intracellular ionized sodium concentrations in red blood cells and diastolic blood pressure in normal pregnant, mild PIH(h) and severe PIH(H) women (3rd trimester).

n.s.: not significant

す。正常妊娠末期妊婦では有意の相関関係が得られなかったが、軽症・重症 PIH 妊婦においては $r=0.655$ ($p<0.02$) の有意な正の相関関係が得られた。

5. 血小板内 Ca^{2+} 濃度の測定成績

正常非妊婦の血小板内 Ca^{2+} 濃度 (nM) は卵胞期 111.0 ± 14.5 , 黄体期 100.9 ± 25.7 であった。正常妊娠初期妊婦の血小板内 Ca^{2+} 濃度は 115.9 ± 20.3 であり正常非妊婦に比べ差を認めなかった。妊娠中期では 99.0 ± 12.3 と妊娠初期に比して低下を示した後、妊娠末期には 115.7 ± 8.0 と妊娠初期の値に回復する傾向を示した。また、妊娠末期の純粹型軽症 PIH 妊婦の血小板内 Ca^{2+} 濃度は 158.1 ± 20.8 で、該当時期の正常妊婦の血小板内 Ca^{2+} 濃度 115.7 ± 19.8 に比し有意の高値 ($p<0.05$) を示した。さらに、重症 PIH 妊婦では 206.4 ± 37.8 と正常妊婦および軽症 PIH 妊婦に比べ有意の高値 ($p<0.01$) であった (Fig. 7)。

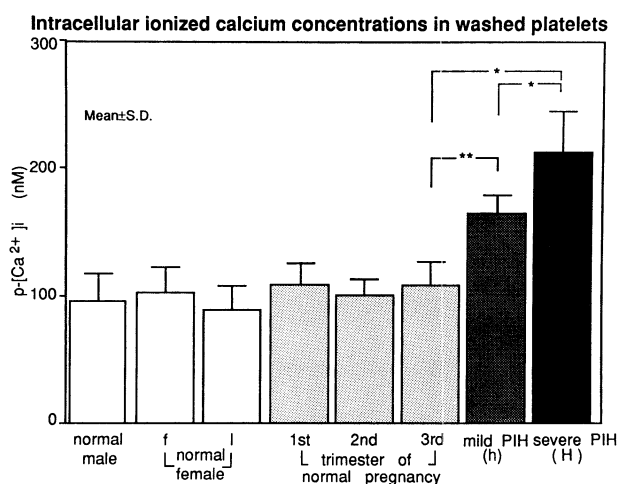


Fig. 7 Intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets from normotensive men, normotensive women (follicular and luteal phase), normal pregnant and PIH women.

'f' denotes follicular phase and 'l' denotes luteal phase.

* $p<0.001$ ** $p<0.05$

正常妊娠末期妊婦および PIH 妊婦における血小板内 Ca^{2+} 濃度と拡張期血圧の関係を Fig. 8 に示す。正常妊娠末期妊婦では有意の相関関係が得られなかったが、軽症・重症 PIH 妊婦においては $r=0.957$ ($p<0.001$) の有意な正の相関関係が得られた。

6. 血小板内 Ca^{2+} 濃度と赤血球内 Na^+ 濃度の相関関係

正常妊娠末期妊婦および軽症・重症 PIH 妊婦における血小板内 Ca^{2+} 濃度と赤血球内 Na^+ 濃度の相関関係についての成績を Fig. 9 に示す。正常妊娠末期妊婦では両者の間に相関係数 $r=0.388$ ($p<0.05$)、一方 PIH 妊婦では相関係数 $r=0.707$ ($p<0.008$) の有意の正の相関が得られた。

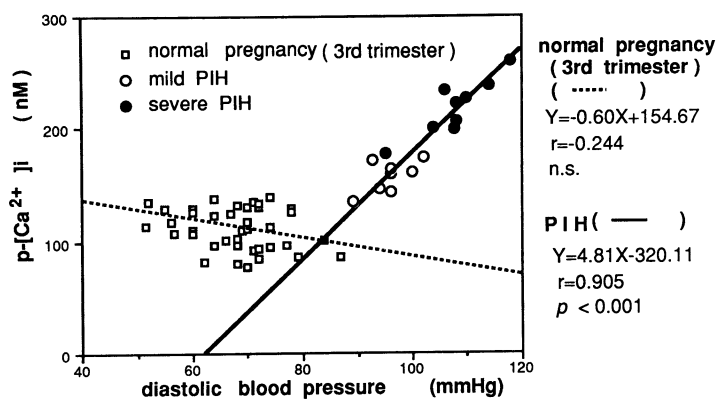


Fig. 8 Relationship between intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets and diastolic blood pressure in normal pregnant, mild PIH(h) and severe PIH(H) women (3rd trimester).
 n.s.: not significant

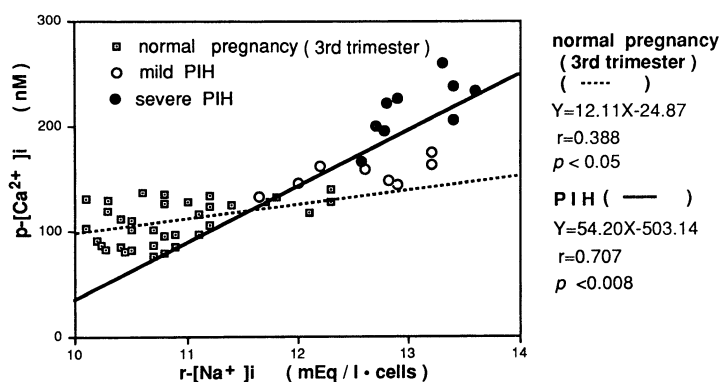


Fig. 9 Relationship between intracellular ionized calcium concentrations in platelets and intracellular ionized sodium concentrations in red blood cells in normal pregnant, mild PIH(h) and severe PIH(H) women (3rd trimester).

7. 血小板内 Ca²⁺濃度に及ぼす正常非妊婦, 正常妊婦および妊娠高血圧症妊婦から得られた血清の影響に関する検討

1) 正常非妊婦あるいは正常妊婦血清の添加

卵胞期あるいは黄体期の正常非妊婦より得られた血清を添加した場合の血小板内 Ca²⁺濃度の変化率は非添加時に比べそれぞれ $14.7 \pm 5.7\%$ (n. s.), $10.5 \pm 2.6\%$ (n. s.) であり, 一方正常妊娠末期妊婦より得られた血清を添加した場合の血小板内 Ca²⁺濃度の変化率は $20.3 \pm 9.1\%$ (n. s.) であり, いずれの場合も有意の変動ではなかった (Fig. 10)。

2) 純粋型軽症あるいは重症 PIH 妊婦より得られた血清添加

純粋型軽症 PIH 妊婦より得られた血清を添加した場合の血小板内 Ca²⁺濃度の変化率は非添加時に比べ $45.9 \pm 8.3\%$ ($p < 0.01$) と有意な増加を示し, さらに純粋型重症 PIH 妊婦より得られた血清を添加した場合の血小板内 Ca²⁺濃度の変化率は非添加時に比べ $98.2 \pm 32.6\%$ ($p < 0.001$) と著明な増加を示した (Fig. 10)。

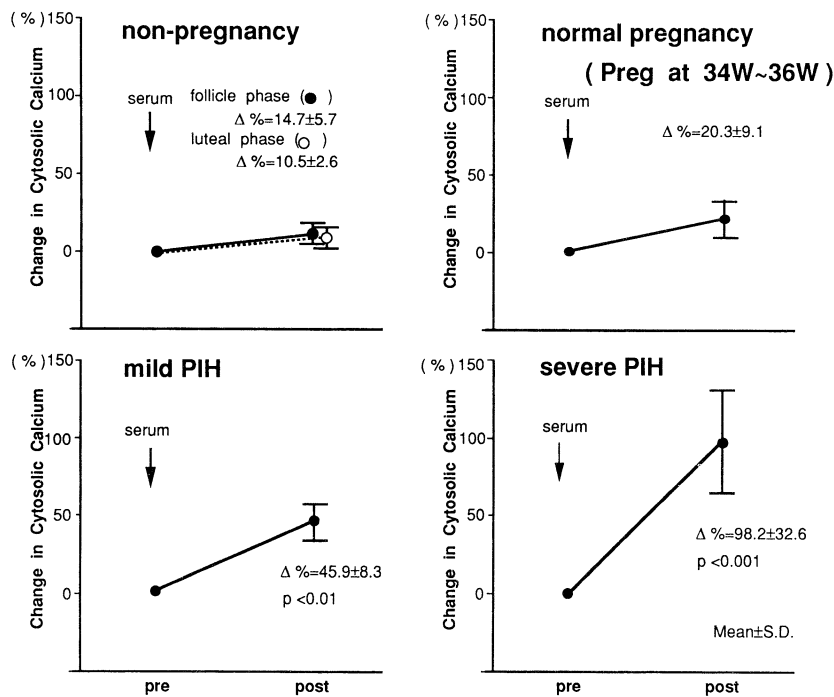


Fig. 10 The changes of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with serum obtained from normotensive women, normotensive pregnant women (pregnancy at from 34 weeks to 36 weeks), mild and severe PIH women.

8. 血小板内 Ca^{2+} 濃度に及ぼすホルモンの影響に関する検討1) 17β -estradiol あるいは Progesterone の添加

17β -estradiol を 1, 10 あるいは 100ng/ml 添加した場合の血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率は非添加時に比べ $5.7 \pm 1.0\%$, $15.9 \pm 0.6\%$ ($p < 0.02$) あるいは $31.4 \pm 9.3\%$ ($p < 0.01$) の増加を示した。Progesterone を 1, 10 あるいは 100ng/ml 添加した場合には、血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $-2.5 \pm 2.3\%$ (n. s.), $3.6 \pm 10.3\%$ (n. s.), $-9.7 \pm 9.6\%$ (n. s.) であった (Fig. 11)。

2) Endothelin-1 あるいは PTH の添加

Endothelin-1 を 1, 10 あるいは 100pg/ml 添加した場合の血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $14.9 \pm 11.2\%$ (n. s.), $39.5 \pm 23.1\%$ (n. s.), $85.7 \pm 19.7\%$ ($p < 0.01$) であった。PTH を 1, 10 あるいは 100ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $18.6 \pm 13.4\%$ (n. s.), $32.1 \pm 16.7\%$ ($p < 0.05$), $27.4 \pm 17.6\%$ (n. s.) であった (Fig. 11)。

3) IGF- I あるいは IGF- II の添加

IGF- I を 10, 100 あるいは 1000ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $33.2 \pm 13.1\%$ (n. s.), $33.6 \pm 16.6\%$ (n. s.), $12.6 \pm 13.4\%$ (n. s.) であった。IGF- II を 10, 100 あるいは 500ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $10.2 \pm 3.5\%$ (n. s.), $11.7 \pm 4.4\%$ ($p < 0.05$), $16.3 \pm 1.5\%$ ($p < 0.05$) であった (Fig. 12)。

4) DHAS あるいは DHA の添加

DHAS を 10, 100 あるいは 1000ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $11.9 \pm 4.8\%$ (n. s.), $8.6 \pm 1.1\%$ (n. s.), $10.7 \pm 6.4\%$ (n. s.) であった。DHA を 1, 10 あるいは 100ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $7.2 \pm 3.7\%$ (n. s.), $7.6 \pm 2.5\%$ (n. s.), $8.7 \pm 5.4\%$ (n. s.) であった (Fig. 12)。

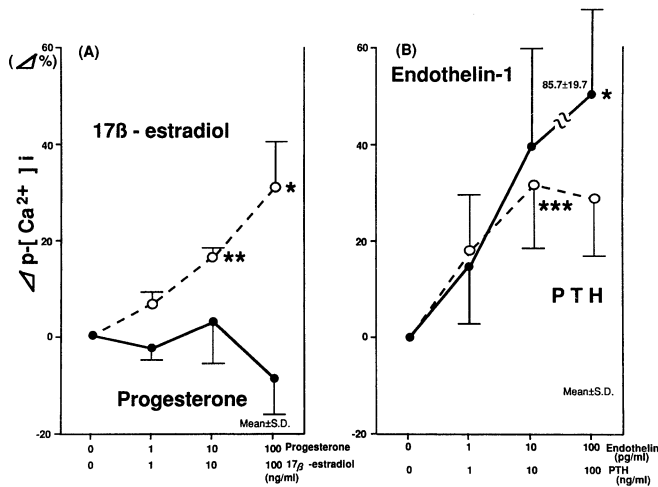


Fig. 11 The changes of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with 17β -estradiol(A), progesterone(A), endothelin-1(B) or PTH(B).

* $p < 0.001$ ** $p < 0.05$ *** $p < 0.01$

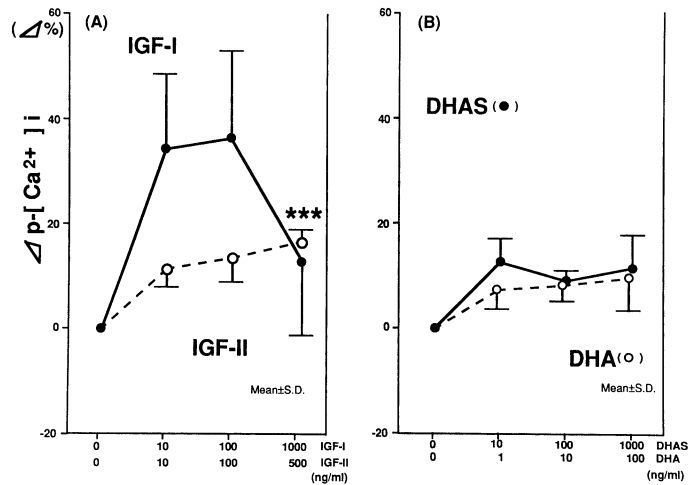


Fig. 12 The changes of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with IGF-I(A), IGF-II(A), DHAS(B) or DHA(B).
* $p < 0.01$

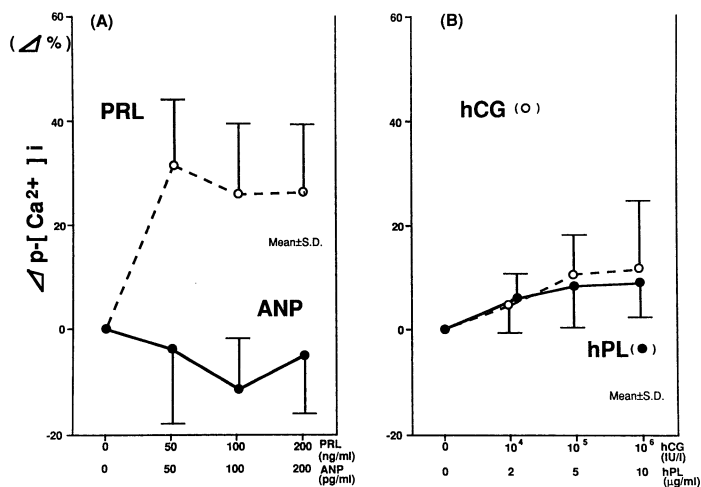


Fig. 13 The changes of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with PRL(A), ANP(A), hCG(B) or hPL(B).

5) ANP あるいは PRL の添加

ANP を50, 100あるいは200pg/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $-3.3 \pm 15.1\%$ (n. s.), $-12.5 \pm 10.5\%$ (n. s.), $-4.8 \pm 9.5\%$ (n. s.) であった。PRL を50, 100あるいは200ng/ml 添加した場合には血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $31.3 \pm 13.0\%$ (n. s.), $26.2 \pm 13.8\%$ (n. s.), $27.2 \pm 12.6\%$ (n. s.) であった (Fig. 13)。

6) hCG あるいは hPL の添加

hCG を 10^4 , 10^5 あるいは 10^6 IU/l 添加した場合には, 血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $4.3 \pm 6.7\%$ (n. s.), $7.2 \pm 11.8\%$ (n. s.), $10.1 \pm 16.3\%$ (n. s.) であった。hPL を2, 5あるいは $10 \mu\text{g/ml}$ 添加では血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率はそれぞれ $4.8 \pm 3.2\%$ (n. s.), $7.6 \pm 3.4\%$ (n. s.), $8.7 \pm 6.1\%$ (n. s.) であった (Fig. 13)。

7) 各ホルモンの混合添加

今回検討した前述のホルモンを, 血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率が最大を示した濃度で混合し, 血小板浮遊液に添加した場合の血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率は $69.1 \pm 20.5\%$ ($p < 0.01$) であった (Fig. 14)。

また, 重症 PIH 患者1例の血清添加では血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率は102.6%の増加を示した (Fig. 15)。一方, 同一 PIH 患者の血中の各ホルモン濃度を測定し, その濃度で各ホルモンを混合し, 血小板浮遊液に添加したところ, 血小板内 Ca^{2+} 濃度の変化率は79.1%と増加の傾向を示した。

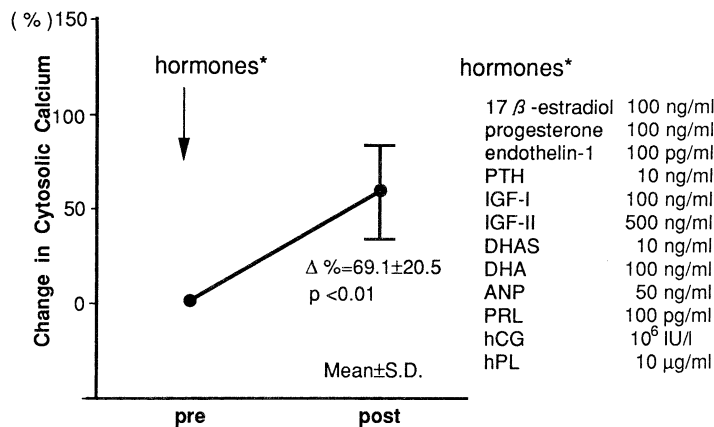


Fig. 14 The changes of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with twelve hormones* (17 β -estradiol, progesterone, endothelin-1, PTH, IGF-I, IGF-II, DHAS, DHA, ANP, PRL, hCG, hPL) at the same time. Each hormone was used in the concentration which showed the maximum change of intracellular ionized calcium concentration by the incubation with single hormone.

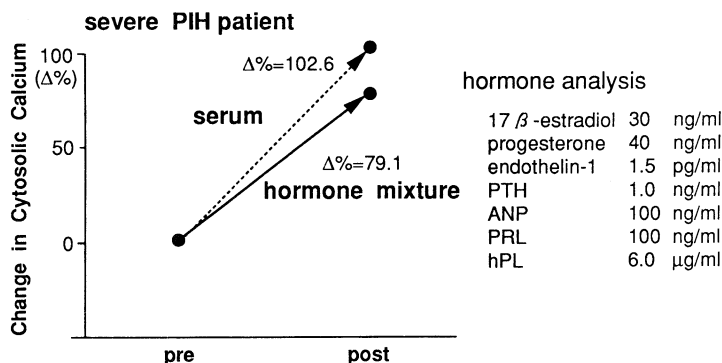


Fig. 15 The change of intracellular ionized calcium concentrations in washed platelets prepared from normotensive men after the incubation with hormones (17 β -estradiol, progesterone, endothelin-1, PTH, ANP, PRL, hPL) at the same time or with serum obtained severe PIH women. Each hormone concentration was used in the same level as estimated in the serum of this PIH women.

考 察

細胞内 Ca^{2+} は、細胞機能の恒常性 (homeostasis) を維持するために重要な役割を果たしているが¹⁰⁾、一方いろいろな疾患の病態において細胞内 Ca^{2+} の変化することが指摘されている。特に本態性高血圧症においては、細胞膜を介する Na^+ および Ca^{2+} 輸送の異常が認められ¹¹⁾、それらによる末梢血管抵抗の増大と末梢血管平滑筋における収縮反応性の亢進が報告されている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾。これらの成績から最近では降圧治療薬として細胞膜を介する Ca^{2+} 流入を阻害する Ca^{2+} channel blocker が多用され、よい成績を得ているのは衆知のごとくである¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。

ところで、妊娠高血圧症 (PIH) においては本態性高血圧症と同様に末梢血管抵抗の増大していることが知られている。そこで本研究ではPIH発症のメカニズム解明を目的として正常妊婦およびPIH妊婦における細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 Na^+ 濃度の動態を比較検討するとともに、液性因子関与の面からも検討を加えた。細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 Na^+ 濃度を測定するにあたって、前者については血小板を、後者については赤血球を用いた。

正常妊婦の血小板内 Ca^{2+} 濃度は、全妊娠期間を通じて非妊婦人とは有意の差を認めなかったが、妊娠中期にはやや低下し末期には妊娠初期の値に回復した。また、正常妊婦の赤血球内 Na^+ 濃度は同様に非妊婦人のレベルと有意の差を認めなかったが、妊娠初期から末期にかけて軽度の増加を示した。一般に、正常妊婦の血圧は正常非妊婦の血圧と比較して有意の差を示さず、かつ妊娠中期に軽度の低下を示すが、末期には初期の血圧に回復するとされている。これらの細胞内陽イオンの濃度が非妊婦と正常妊婦の間で差を認めず、しかも妊娠期間中の動態が血圧の変動と一致するパターンを示したことは、これらのイオンが末梢血管抵抗の維持と密接に関係していることを示唆する。しかし一方では、正常妊娠末期妊婦の細胞内 Ca^{2+} あるいは Na^+ 濃度と拡張期血圧との間には有意の相関が認められなかったことから、正常妊婦においてはこれらの陽イオンが多少高値となっても直ちに血圧上昇につながらないような巧妙な調節機構の予備能力の存在が推察される。

細胞内 Na^+ の調節には主として Na-pump , $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換機構などが¹⁹⁾, また細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節には $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換機構, Ca-pump , 種々の Ca-channel などが作動している²⁰⁾²¹⁾ ので, 正常妊娠ではそれらの陽イオン濃度は極端な高値とはならず, 従って血圧の上昇は起こらないものと思われる。

正常妊婦の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動については報告が少なく, Kilby ら²²⁾, Sower ら²³⁾ などがあるにすぎない。Kilby ら²²⁾ は, 妊娠初期と中期には正常非妊婦と差を認めなかったが, 妊娠末期には有意の上昇を示したと報告している。しかし, 彼らの測定した正常妊婦の血圧は, 初期や中期に比して末期には有意の高値であったと述べていることから, 対象に用いた正常妊婦の選択に問題があったのではないと思われる。一方, Sower ら²³⁾ は, 妊娠末期の細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞内 Na^+ 濃度を測定し, これらの陽イオン濃度は非妊婦との間に差を認めず, 妊娠時の末梢血管抵抗にはあまり影響を与えていないのではないかと述べており, 著者等の成績と類似している。

一方, 妊娠高血圧症 (PIH) 妊婦の細胞内 Na^+ 濃度と Ca^{2+} 濃度を測定したところ, 該当時期の正常妊婦に比べ有意に増加し, 特に重症型において著明であった。

一般に, 血小板を使って細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態を調べる場合には, 使用した血小板が採血時に活性化されたために細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加という結果になると指摘する意見がある。そこで著者らは, まず使用した血小板について MPV および thrombin に対する反応性を検討するとともに, 採血時の活性化を評価する目的で PF-4, β -TG を測定し, 用いた血小板が採血操作により活性化されていないかどうかを検討した。MPV は血小板の機能および血小板動態を評価するうえで最近注目されているが²⁴⁾, 著者らの成績では PIH 妊婦と正常妊婦の間で差を認めず, また thrombin に対する反応性についても差を認めなかった。一方, PF-4・ β -TG の変化については中林²⁵⁾ が PIH 妊婦では正常妊婦に比して有意の増加を示し, PIH という病態においては血小板が有意に活性化していることを報告しているが, 著者らの成績では, PIH 妊婦と正常妊婦の間に有意の差を認めなかった。PF-4 と β -TG は採血条件で著しく変化することから, 中林²⁵⁾ の報告による成績は, 多施設での成績であること, また各施設での血小板の採取方法が不十分であったため, 採血時に血小板が活性化された可能性を否定できないものと思われる。今回の我々の検討では血小板採取のための採血に際しては前述したごとく特に厳密な方法を用い, 採血による影響を極力おさえた。その結果, PF-4 と β -TG は PIH ではやや増加は認められたが, 有意の差は認められなかった。斉藤ら²⁶⁾ は, 妊娠中毒症妊婦の血小板電子顕微鏡像での検討をおこなっているが, 血小板の幼若大型のものが増加していること, および脱顆粒の頻度は増していないもののその前段階と考えられている α 顆粒電子密度の低下を来している血小板が増加していると報告している。つまり, 著者らが検討したのと同じ内容を斉藤ら²⁶⁾ は形態学的手法で検討して, 著者らの成績を支持する結果を得ている。従って, PIH 妊婦の血小板は細胞内 Ca^{2+} 濃度が有意に増加するほど活性化されていないものと考えてよいようである。

また, 血小板を分離する方法として遠心分離法²²⁾ とゲル濾過法²⁷⁾ の2種類があり, いずれの場合でも血小板はほとんど活性化されないという成績が指摘されているので著者らは前者の方法を用いた。

一方, PIH 妊婦において, 細胞内 Na^+ 濃度を上昇させる機構については三村ら¹⁾ が詳しく検討している。彼らの報告によれば, 軽症型 PIH 妊婦では正常妊婦に比べ細胞内 Na^+ 濃度が増加することにより血圧は上昇するが, 細胞膜 Na-pump 活性が代償的に亢進して細胞内 Na^+ 濃度を低下させるように働くので, 血圧の上昇は最小限度にとどまるといえる。しかし, 重症型 PIH では, Na-

pump の代償機能が破綻して、細胞内 Na^+ 濃度が極端な高値となるため、著明な高血圧が発症するとしている。本態性高血圧症では、遺伝子素因に基づく細動脈平滑筋の膜異常があるため細胞膜 Na^+ -pump 活性の低下が先に起こり、その結果細胞内 Na^+ 濃度が上昇すると考えられている²⁸⁾。PIH 妊婦ではそれとは異なり先に細胞内 Na^+ が増加し、 Na^+ -pump は正常に作動してこれを低下させるように働くが、ついにその機能が破綻するという Dahl の食塩感受性高血圧ラットとよく似たタイプであると指摘している。

細胞内 Na^+ 濃度が増加すれば、細胞膜の Na^+ - Ca^{2+} 交換機構を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加することになる²⁹⁾。今回、実際に PIH 妊婦の細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定したところ、細胞内 Na^+ の増加と細胞内 Ca^{2+} の増加が共存し、しかも細胞内 Na^+ 濃度と細胞内 Ca^{2+} 濃度との間には有意の相関が認められたことから、PIH 妊婦の細胞内 Ca^{2+} 濃度には細胞内 Na^+ 濃度の増加が重要な調節因子の1つとなっていることを示唆する。

ところで、前述のごとく、細胞内 Ca^{2+} 濃度は Na^+ - Ca^{2+} 交換機構を介するのみではなく、 Ca^{2+} -pump, voltage dependent channel, receptor operated channel などによっても調節されている。

例えば、Lindner ら³⁰⁾は、本態性高血圧症より得られた血清には直接細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる液性因子の存在を指摘している。そこで、血小板と妊婦の血清や種々のホルモンをインキュベートして細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べてみた。その結果、非妊婦人や正常妊婦の血清を加えても細胞内 Ca^{2+} 濃度は有意の変動を示さなかったが、PIH 妊婦の血清を加えると細胞内 Ca^{2+} 濃度は有意に増加した。つまり、PIH 妊婦の血清中には細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる因子の存在することが判明した。

そこで、PIH 妊婦血中にて増減するホルモンを同じ血小板インキュベーション系に加えて分析を試みた。細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させるホルモンとしては、 17β -estradiol, endothelin-1 (ET-1), PTH, IGF-1, PRL などがあり、一方減少させるホルモンとしては progesterone, ANP などのあることが確かめられた。石井ら³¹⁾によると、 17β -estradiol は Ca^{2+} -channel の親和性を増加させ細胞内への Ca^{2+} 流入を増加させるが、progesterone は細胞内貯蔵 Ca^{2+} を増加させ平滑筋収縮を阻害するといわれており、そのために正常非妊婦卵胞期に比して黄体期の細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下すると思われる。また endothelin-1 の添加では細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加すること³²⁾、および PTH が増加した状態では細胞内への Ca^{2+} 流入が起こることはすでに報告されている³³⁾。さらに IGF-I や IGF-II 添加により細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加したが、Thakker ら³⁴⁾の報告では IGF による細胞内への Ca^{2+} 流入増加作用は、 Ca^{2+} 透過性電位非依存性イオンチャンネルを活性化することによるといわれている。ただ、IGF-I と IGF-II は、ともに多数の細胞の増殖を促進させる成長因子としての作用はもつものの、細胞種によりその作用が微妙に異なっていることが報告されており、両者の細胞内 Ca^{2+} 濃度調節作用にも差があったことは、両者の生物作用が標的臓器レベルで異なることを示唆するものと思われる。

PRL 添加でも細胞内 Ca^{2+} 濃度は有意に増加した。Horrobin ら³⁵⁾は、PRL は腎よりの水、 Na^+ の排出を低下させる作用があることを報告、また Manku ら³⁶⁾はノルアドレナリンや angiotensin などの昇圧物質に対する血管平滑筋の感受性が PRL によって亢進することを報告していることから、PRL が高値を示す PIH において PRL が関与している可能性が推察される。三村ら³⁾は同じように赤血球を用いた実験で、細胞内 Na^+ 濃度に影響を与えるホルモンを調べているが、 17β -estradiol, PTH, PRL などが増加に、また progesterone, hPL などが減少に働くとしている。従っ

て、PIH 妊婦の血中に増加するホルモンの中で、ET, PTH, PRL は細胞内 Na^+ 濃度を増加させることにより $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換機構を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、また同時に直接細胞膜の Ca -channel などに働いて細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させているものと思われる。これに対して細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させる作用を持つホルモンはわずかに progesterone, ANP のみであり、総合的には PIH 妊婦では細胞内 Na^+ 濃度と細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加して末梢血管抵抗の増加が惹起されることになる。

ただし、今回は妊娠に深く関わっているホルモンについてのみ検討したが、その他 angiotensin, aldosterone, dopamine, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 阻害因子、さらには血中に存在するその他の物質が細胞内 Ca^{2+} 濃度に影響を与えることも十分考えられるので、次の段階として検討を加えているところである。

PIH 妊婦の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動については、Kilby ら²²⁾, Zemel ら³⁷⁾ が検討し、増加していると報告している。Kilby ら²²⁾ は、血小板の活性化を防ぐために acetylsalicylic acid を使用しており、著者らが同様の目的で prostacyclin を使用しているのとはほぼ同様の実験系を使用している。しかし、実際に測定に供した血小板の population の評価および PF-4 や β -TG などによる血小板の脱顆粒の程度の検討がされていないこと、採血の条件によって血小板の活性化の程度が著しく変化するにもかかわらず採血の条件が明示されていないことから、PIH や pre-eclampsia での血小板内 Ca^{2+} 濃度の増加が血小板の population の違いや活性化によるものなのかが不明瞭であった。また、Zemel ら³⁷⁾ は arginine vasopressin および thrombin に対する反応性を検討しているが、同様に各群での血小板の population の評価はなされていない。今回著者は、血小板内 Ca^{2+} 濃度の増加は血小板の活性化によるものではないことを明らかにすることができた。

以上の成績から、PIH という病態成立には細胞内 Na^+ 濃度とともに細胞内 Ca^{2+} 濃度の動態が深く関与しており、しかも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の原因として PIH 妊婦の細胞内 Na^+ 濃度の増加に基づくものと、あわせて血清中に存在する液性因子の細胞膜 Ca channel などへの作用が考えられた。しかも、この液性因子は単一のものではなく、PIH という特殊なホルモン環境における各ホルモンの総合的な作用としてあらわれていることが明らかとなったが、どのような作用機構で細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させるかについては、今後検討したい。

結 語

PIH 妊婦における高血圧発症におよぼす血小板内 Ca^{2+} 濃度および赤血球内 Na^+ 濃度の影響を検討し、以下の成績を得た。

- 1) 正常妊婦における血小板内 Ca^{2+} 濃度および赤血球内 Na^+ 濃度の変動は拡張期血圧の変動とよく相関しており、細胞機能が正常に保たれていることが推察される。
- 2) PIH 妊婦では、正常妊娠末期妊婦に比べ血小板内 Ca^{2+} 濃度および赤血球内 Na^+ 濃度が有意に増加することが、末梢血管抵抗の増大を惹起し、高血圧を発症するという機構の存在が推察された。
- 3) 血清添加実験より、PIH 妊婦より得られた血清中に細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させる液性因子が存在し、PIH の発症と維持に深く関与していることが示唆された。

稿を終える御懇篤な御指導ならびに御校閲をいただいた望月真人教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の要旨は, 第7回国際妊娠高血圧症学会 (1990, Perugia, Italy), 第43回日本産科婦人科学会 (平成3年, 京都), 第64回日本内分泌学会 (平成3年, 東京) において発表した。

この研究の一部は日母おぎゃー献金基金研究費 (昭和63年度) および文部省科学研究費 (昭和63年度一般 B 63480368) によった。

文 献

- 1) 三村 治, 森川 肇, 山崎峰夫, 望月真人: 妊娠高血圧症発症の機序に関する研究—特に細胞膜 Na⁺ 輸送動態の解析—. 日本内分泌学会誌. 1988; 64: 463—81
- 2) Chaudhuri SK. Dietetic deficiency in toxemia of pregnancy. Indian Pract. 1969; 22: 131—4
- 3) Groenendijk R, Trimbos JBMJ, Wallenburg HCS. Hemodynamic measurements in preeclampsia: Preliminary observations. Am J Obstet Gynecol. 1984; 150: 232—6
- 4) Lim YL, Walters WAW. Haemodynamics of mild hypertension in pregnancy. Br J Obstet Gynecol. 1979; 86: 198—204
- 5) Tranquilli AL, Mazzanti L, Rabini RA, Cugini AM, Cecchi A, Bilancia F, Cester N, Romanini C. Altered cation transport in gestational hypertension-II. Calcium-. Clin Exper Hyper-Hyper in Pregnancy. 1988; B7: 23—36
- 6) Belizan JM, Villar J, Zalazar A, Rojas L, Chan D, Bryce GF. Preliminary evidence of the effect of calcium supplementation on blood pressure in normal pregnant women. Am J Obstet Gynecol. 1983; 146: 175—80
- 7) 鈴木雅州: 妊娠中毒症問題委員会報告 (妊娠中毒症について第一次案説). 日産婦人誌. 1984; 36: 983—9
- 8) 萱 晴美, 鈴木幸一郎, 田伏久之, 小浜啓次: 赤血球内 Na, K の測定に関する研究 (第1報) —ヘマトクリット毛細管を使用した測定方法について—. 臨床病理. 1979; 27: 41—5
- 9) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. 1985; 260: 3440—50
- 10) Ardlie NG. Calcium ions, drug action and platelet function. Pharmac Ther. 1982; 18: 249—70
- 11) Blaustein MP. Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation, and hypertension: a reassessment and a hypothesis. Am J Physiol. 1977; 232: C165—73
- 12) Bühler FR, Resink TJ. Platelet membrane and calcium control abnormalities in essential hypertension. Am J Hypertens. 1988; 1: 42—6
- 13) Gant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, MacDonald PC. A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy. J Clin Invest. 1973; 52: 2682—9
- 14) Resnick LM. Uniformity and diversity of calcium metabolism in hypertension. Am J Med. 1987; 82: 16—26
- 15) Zidek W, Vetter H. Cellular calcium metabolism in primary hypertension. Klin Wochenschr. 1987; 65: 155—60
- 16) Deeg P, Weiss KH, Schmitz H: Nisoldipin in der therapie der essentiellen hypertonie,

- Wirkung und Vertraglichkeit. Detsch Med Wochenscher. 1987; 112: 429-33
- 17) Erne P, Bolli P, Burgisser E, Bühler FR: Correlation of platelet calcium with blood pressure. N Eng J Med. 1984; 310: 1084-8
 - 18) Gould BA, Hornung RS, Mann S, Subramanian VB, Raftery EB. Nifedipine or verapamil as sole treatment of hypertension, an intraarterial study. Hypertension. 1983; 5(suppl. II): 91-6
 - 19) Sweadner KJ, Goldin SM. Active transport of sodium and potassium ions—mechanism, function, and regulation—. N Eng J Med. 1980; 302: 777-83
 - 20) Bühler FR, Resink TJ. Platelet abnormalities and the pathophysiology of essential hypertension. Experimentia. 1988; 44: 94-7
 - 21) Resnick LM, Laragh JH. The significance of calcium and calcium-channel blockade in essential hypertension. Hypertension. 1983; 3(suppl. 3): S541-4
 - 22) Kilby MD, Pipkin FB, Cockbill S, Heptinstall S, Symonds EM. A cross-sectional study of basal platelet intracellular free calcium concentration in normotensive and hypertensive primigravid pregnancies. Clin Sci. 1990; 78: 75-80
 - 23) Sowers JR, Zemel MB, Walsh MF, Standley PR, Zemel PC, Bronsteen RA, Kraniak J, Sokol RJ. Effects of normal pregnancy on cellular cation metabolism and peripheral vascular resistance. Am J Hypertens. 1990; 3: 16-22
 - 24) Walker JJ, Cameron AD, Bjornsson S, Singer CRJ, Fraser C. Can platelet volume predict progressive hypertensive disease in pregnancy? Am J Obstet Gynecol. 1989; 161: 676-9
 - 25) 中林正雄: 凝固線溶系からみた妊娠中毒症の発症病態. 日産婦人誌. 1988; 40: 1000-9
 - 26) 齊藤良治, 高橋修三, 田口純子, 真木正博: 妊娠中毒症妊婦の血小板電顕像について. 産婦血液. 1980; 4: 31-4
 - 27) Barr SM, Lees KR, Butters L, O'Donnel A, Rubin PC. Platelet intracellular free calcium concentration in normotensive and hypertensive pregnancies in the human. Clin Sci. 1989; 76: 67-71
 - 28) 青木久三: 高血圧の臨床. 青木久三編集. 東京: 新興医学出版社, 1982: 1-29
 - 29) Smith JB, Zheng T, Smith L. Relationship between cytosolic free Ca^{2+} and $\text{Na}^{+}-\text{Ca}^{2+}$ exchange in aortic muscle cells. Am J Physiol. 1989; 256: 147-54
 - 30) Lindner A, Kenny M, Meacham AJ. Effects of a circulating factor in patients with essential hypertension on intracellular free calcium in normal platelets. N Eng J Med. 1987; 316: 509-13
 - 31) Ishii K, Kano T, Ando J. Calcium channel, Ca^{++} mobilization, and mechanical reactivity of estrogen- and progesterone-treated rat uterus. Jpn J Pharmacol. 1986; 41: 47-54
 - 32) Yanagisawa M, Kurihara H, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature. 1988; 332: 411-5

- 33) Wallach S, Bellavia JV, Schorr J, Schaffer A. Tissue distribution of electrolytes, ⁴⁵Ca and ²⁸Mg in experimental hyper- and hypoparathyroidism. *Endocrinology*. 1966; 78: 16-28
- 34) Thakker JK, DiMarchi R, MacDonald K, Caro JF. Effect of insulin and insulin-like growth factors I and II on phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate breakdown in liver from humans with and without type II diabetes. *J Biol Chem*. 1989; 264: 7169-75
- 35) Horrobin DF, Burstyn PG, Lloyd IJ, Durkin N, Lipton A, Muiruri KL. Actions of prolactin on human renal function. *Lancet*. 1971; 2: 352-4
- 36) Manku MS, Nassar BA, Horrobin DF. Effects of prolactin on the responses of rat aortic smooth muscle preparations to noradrenaline and angiotensin. *Lancet*. 1973; 2: 991-4
- 37) Zemel MB, Zemel PC, Berry S, Norman G, Kowalczyk C, Sokol RJ, Standley PR, Walsh MF, Sowers JR. Altered platelet calcium metabolism as an early predictor of increased peripheral vascular resistance and preeclampsia in urban black women. *N Eng J Med*. 1990; 323: 434-8

(受付日: '91. 8. 14 特掲)

(採択日: '91. 10. 8)