

## P-1. 排尿筋過活動を伴う前立腺肥大症患者における、排尿筋収縮力と過活動膀胱症状ならびに排尿筋過活動パラメーターとの相関に関する検討

<sup>1</sup>九州大学大学院医学研究院泌尿器科学, <sup>2</sup>原三信病院泌尿器科

関 成人<sup>1</sup>, Nouval Shhab<sup>1</sup>, 梶岡 俊一<sup>1</sup>, 高橋 良輔<sup>1</sup>, 武井 実根雄<sup>2</sup>, 山口 秋人<sup>2</sup>, 内藤 誠二

【目的】排尿筋過活動 (DO: detrusor overactivity) を伴う前立腺肥大症 (BPH: Benign Prostatic Hyperplasia) 症例において、排尿筋収縮力と排尿筋過活動の各パラメーターならびに過活動膀胱 (OAB: Overactive Bladder) 症状の相関を明らかにする【方法】経尿道的前立腺切除術 (TURP: Transurethral Resection of the Prostate) が施行された 231 症例の DO を伴う BPH に関して後ろ向きの検討を行った。術前の OAB 症状 (尿意切迫感, 昼間頻尿, 夜間頻尿) は国際前立腺症状スコアにて定量化した。全ての症例には術前に尿流測定を含む尿流動態機能検査がなされていた。排尿筋収縮力は BCI (Bladder Contractility Index) ならびに Wmax (Maximum Watt factor) を指標として定量化した。BCI ならびに Wmax と、個々の OAB 症状あるいは DO の尿流動態特性との相関を解析した。【結果】BCI ならびに Wmax と、尿意切迫感スコア、DO の最大振幅ならびに DO の立ち上がり速度との間には有意な相関が認められた。また BCI ならびに Wmax と年齢は負の相関を、前立腺体積とは正の相関を示した。【結論】排尿筋収縮力は、DO の特性 (振幅と立ち上がり速度) のみならず OAB の中心症状である尿意切迫感と有意に相関することが示された。

## P-2. マウス膀胱平滑筋における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の筋原性自発収縮運動への機能的役割

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学, <sup>2</sup>福岡大学医学部薬理学

村田 秀道<sup>1</sup>, 堀田 真吾<sup>1</sup>, 山村 寿男<sup>1</sup>, 大矢 進<sup>1</sup>, 岩本 隆宏<sup>2</sup>, 今泉 祐治<sup>1</sup>

【目的】 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送体 (以下 NCX) は細胞内外への両方向性  $\text{Ca}^{2+}$  輸送 ( $\text{Ca}^{2+}$  排出モードと  $\text{Ca}^{2+}$  流入モード) により、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) を制御している膜タンパクである。我々は、平滑筋特異的に NCX1.3 を高発現させた遺伝子改変マウス (NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup>) を用いることにより、興奮時における  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇後の静止状態への減少が、NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup> 膀胱平滑筋で野生型マウス (WT) より有意に亢進していることを発見し、平滑筋 NCX の  $\text{Ca}^{2+}$  排出モードについて以前報告した。今回は、 $\text{Ca}^{2+}$  流入モードの平滑筋  $\text{Ca}^{2+}$  動態への寄与について、検討を行った。

【方法】マウスから膀胱を摘出し、内膜除去後、静止時膀胱自発収縮を記録した。また、単離平滑筋細胞を作製し、ホールセルパッチクランプ法により膜電流記録を行った。

【成績】膀胱自発収縮を記録したところ、WT に比べ NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup> で収縮力が有意に亢進していることを発見した。さらに、300 nM Nicardipine により、WT では自発収縮は消失するが NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup> では約 50% 程度の減弱しか認められなかった。膀胱単離平滑筋細胞における L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル電流は両群で変化は認められなかった。NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup> 自発収縮の Nicardipine 非感受性成分は、NCX 阻害薬である 10  $\mu\text{M}$  KB-R7943 により消失した。また、リアノジン受容体 (RyR) 阻害薬の 50  $\mu\text{M}$  Ryanodine により自発収縮は消失したが、IP<sub>3</sub> 受容体阻害薬の 10  $\mu\text{M}$  Xestospongine C では変化は見られなかった。

【結論】NCX1.3<sup>Tg/Tg</sup> 膀胱平滑筋で NCX は、静止時において  $\text{Ca}^{2+}$  流入モードとして機能し、RyR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を制御していることにより、自発収縮亢進に寄与していることが示唆された。

### P-3. Functional roles of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels, NaV1.6, in murine vas deferens myocytes

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学

寺本 憲功, 朱 海雷

Patch-clamp experiments were performed to investigate functional roles of NaV1.6 in vas deferens myocytes dispersed from NaV1.6-null mice (NaV1.6<sup>-/-</sup>) lacking the expression of *Scn8a* and their wild-type littermates (NaV1.6<sup>+/+</sup>). In NaV1.6<sup>+/+</sup>, the threshold of the inward currents evoked by ramp potential pulses (20 ms duration; from -100 mV to +60 mV) was  $-39.1 \pm 4.0$  mV. Tetrodotoxin (1  $\mu$ M) shifted the threshold to positive potentials ( $-31.2 \pm 3.7$  mV). In NaV1.6<sup>-/-</sup>, the threshold of the inward currents was  $-30.4 \pm 3.4$  mV. When the duration of the ramp pulse was less than 20 ms, the bell-shaped currents of voltage-gated inward Na<sup>+</sup> current ( $I_{Na}$ ) were overlapped in the presence of 100  $\mu$ M Cd<sup>2+</sup>. When the duration of the ramp potential pulses became longer, the peak amplitude of  $I_{Na}$  gradually became smaller, and at 1.6 s duration,  $I_{Na}$  was disappeared. When the depolarizing potentials of the ramp pulses changed from -60 mV to +60 mV,  $I_{Na}$  was evoked at more positive potentials than -30 mV. These results suggest that rapid changes of the membrane potentials at more positive potentials than +30 mV activate NaV1.6 in murine vas deferens myocytes, depending on the duration and voltage- steep of ramp depolarization.

### P-4. SSRI による腸管運動ペースメーカー調節の Ca イメージング

名古屋大学大学院医学研究科細胞生理学

劉 紅年, 中山 晋介

【目的】日本では、年間3万の人自殺者がいる。その背景には、50%の人はうつ病の存在が疑われている。うつ治療薬としてSSRI (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor) 選択的セロトニン再取り込み阻害剤が使われているように、うつ病にセロトニンが深く関わっていることは明らかである。セロトニン (5-HT, 5-hydroxytryptamine) は、脳内に全身の2%しかなく、実は95%以上が胃腸管に存在する。本研究では、内因性セロトニンによる腸管運動ペースメーカー機構調節の実験を主体に行った。また、その結果をCaイメージング法によって解析した。【方法】1. マウス小腸標本作成 BALB/C マウス生後20日の腸筋層を摘出した後、この標本に fluo-3AM を室温下でロードし、fluor-3 蛍光強度の変化を細胞内Ca濃度変動の指標として記録した。2. 細胞外電位測定マウスの腸管から、平滑筋層を得た。これに薬剤を投与し、c-kit 陽性細胞の電気活動を64チャネル細胞外電位記録システムで記録した。【結果】Nifedipine, TTX の存在下で5-HT, SSRI 投与後にICCのCa oscillationの駆動、維持することを観察された。同時に細胞外からのCa流入阻害剤であるSK&FはCa oscillationを抑制した。これらの結果は、5-HT受容体のシグナルは細胞外からのCa流入を引き起こすことによってICCのペースメーカー活動を促進することを示唆している。また、薬剤によって細胞内の内因性5-HTを枯渇させた後、5-HTを加えたところ、正常な筋層と比較して、ICCの活動減弱がみられた。【考察】脳のうつ治療薬としてSSRIが使われていることは広く知られている。今回、腸管においてもSSRIはペースメーカー活動に寄与することを見出した。今後、過敏性腸炎を含めて、脳腸関連の観点から、うつ病の改善と消化管ペースメーカー維持機構の解明が期待できる。

## P-5. 平滑筋 X 線回折による筋フィラメント格子状配列動態解析の試み

<sup>1</sup> 東京医科大学細胞生理学講座, <sup>2</sup>CREST, <sup>3</sup> 東京慈恵会医科大学, <sup>4</sup> 文京学院大学, <sup>5</sup>JASRI/SPRing-8

渡辺 賢<sup>1,2</sup>, 木村 雅子<sup>3</sup>, 湯本 正寿<sup>1,3</sup>, 山口 眞紀<sup>3</sup>, 八木 直人<sup>5</sup>, 小西 真人<sup>1</sup>, 竹森 重<sup>3</sup>, 石田 行知<sup>4</sup>

平滑筋の収縮フィラメント構造動態を探索するため、我々はモルモット盲腸紐  $\beta$ -エスシンスキンド標本の X 線回折実験を行っている。筋標本に強い放射光を照射した際に得られる小角散乱像のうち赤道反射は、筋収縮フィラメントの規則的な配列を示す。従来、盲腸紐の幅広の赤道反射は、11-12 nm 周期の細いフィラメント格子様配列に由来するとされ、生筋活動時の反射強度増強が観察されているが、定量的な解析はいまだ行われていない。そこで今回、1) 11-12 nm にピークを持つ反射の他に筋フィラメント配列由来の赤道反射が存在するか確認すること、2) 筋フィラメント配列由来の赤道反射強度の定量的な解析を行うこと、を目的として、イメージングプレートに記録した赤道反射パターンの回帰分析を解析ソフトウェア MATLAB を用いて行った。未だ解析標本数が少ないために断定はできないが、現在までに得られた傾向は以下の 2 点である。1) (a) 11 nm 付近にピークを持つ既知の赤道反射以外に (b) 13.7 nm, (c) 22 nm の 2 種類の赤道反射のピークがみられる。2)  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下の弛緩状態に比べて、硬直（無 ATP）条件やアクチンフィラメント脱重合薬 cytochalasin D 添加時には、(a) 11 nm にピークを持つ赤道反射強度が弱くなる。(b) (c) の反射の由来、またこれらの反射強度変化の理由について、今後再現性も含めて検討が必要であるが、今回の試みから平滑筋における細いフィラメントもしくは別のフィラメント由来の未知の格子構造の存在とその動的変化が明らかになった。赤道反射解析による収縮・弛緩・硬直サイクルに伴うフィラメント格子構造変化の経時的追跡は、平滑筋標本においても可能であろう。

## P-6. ラット結腸基部 P 領域平滑筋における自動運動の神経性制御

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学, <sup>2</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学

加藤 岳史<sup>1</sup>, 今枝 憲郎<sup>1</sup>, 中村 江里<sup>2</sup>, 鈴木 光<sup>2</sup>

ラット結腸基部 P 領域は、筋間神経層と粘膜下層にカハールの介在細胞 (ICC) が分布している。摘出した P 領域輪走平滑筋から粘膜層だけ除去した標本 (intact 標本: 縦走筋、粘膜下層は付着) では 2 種の振幅の phasic 収縮が律動的に発生し、頻度は大きな phasic 収縮が毎分 1 回程度、小さな phasic 収縮が毎分 10 回程度であった。粘膜下層を除去した無粘膜下層標本では大きな収縮のみが発生した。縦走筋（とおそらく筋間神経層）を除去した輪走筋標本では、小さな phasic 収縮のみが発生した。この結果から、P 領域輪走平滑筋は筋間神経層に分布する ICC-MY と粘膜下に分布する ICC-SM により収縮していることがわかった。intact 標本に経壁的に電気パルスを与え神経刺激 (TNS) すると、これらの phasic 収縮反応の振幅は強く抑制されたが収縮頻度は不変だった。無粘膜下標本に TNS を与えると大きな phasic 収縮の発生は停止した。輪走筋標本に TNS を与えると、収縮の振幅だけ抑制された。TNS 反応へのアトロピンとニトロアルギニンの効果を検討すると、NO 作動性抑制神経の役割が大きいことがわかった。コリン作動性興奮神経も認められたが弱く、コリンエステラーゼを抑制すると TNS による興奮作用（頻度増加、phasic 収縮振幅増大）が認められた。非アドレナリン作動性非コリン作動性抑制神経も P 領域に分布していたが、その伝達物質は不明であった。intact 標本をアセチルコリンで刺激すると、大きな phasic 収縮は抑制され、小さな phasic 収縮に対して興奮作用があった。Na-ニトロプルシドは phasic 収縮の頻度を大きく変えずに振幅を抑制した。ATP 投与では大きな phasic 収縮に対し抑制作用があったが、小さな phasic 収縮に対し興奮作用があった。以上より、P-領域輪走平滑筋の自発収縮は ICC-MY と ICC-IM によって駆動されており、それぞれ NO 作動性抑制神経、コリン作動性興奮神経、非アドレナリン作動性非コリン作動性抑制神経により活動が制御されていることがわかった。

## P-7. 六君子湯によるグレリンを介したラット胃・十二指腸運動の改善作用

<sup>1</sup>鹿児島大学大学院医歯学総合研究科社会・行動医学講座行動医学分野, <sup>2</sup>株式会社ツムラ ツムラ研究所

藤塚 直樹<sup>1,2</sup>, 浅川 明弘<sup>1</sup>, 服部 智久<sup>2</sup>, 鮫島 真理恵<sup>1</sup>, 網谷 東方<sup>1</sup>, 児島 真哉<sup>1</sup>, 乾 明夫<sup>11</sup>

背景：六君子湯は、食欲不振、悪心・嘔気、胃部膨満感や不快感などの上部消化管機能不全に対して臨床的有效性が報告されている。一方、食欲増進ペプチドであるグレリンは、生理的消化管運動に対する調節作用を有する。本試験では、選択的セロトニン再取込阻害薬（SSRI）によるラット消化管運動不全モデルを用い、六君子湯の改善作用とグレリンの関与について検討した。

方法：SSRI（フルボキサミン、パロキセチン、フルオキセチン、フェンフルラミン）を、それぞれ24時間絶食ラットに腹腔内あるいは脳室内投与した。消化管運動は、無麻酔、非拘束の状態でストレンジャージトランスデューサーによって測定した。血漿アシルグレリン濃度はEIA法で、胃排出はフェノールレッド法で測定した。グレリン（0.3-3 nmol/rat, i.v.）、グレリン受容体阻害薬（D-Lys3）GHRP-6（2-4 μmol/rat, i.v.）および六君子湯（62.5-1,000 mg/kg, p.o.）を投与し、薬効評価を行った。

結果：絶食ラットにSSRIを投与した結果、胃前庭部と十二指腸の空腹期運動（フェーズⅢ様収縮）は低下し、食後期様運動に変換された。また血漿アシルグレリン濃度は有意に低下した。SSRI処置ラットへのグレリン投与はフェーズⅢ様収縮を有意に増加させた。また六君子湯は血漿アシルグレリン濃度およびフェーズⅢ様収縮を有意に増加させた。さらに摂餌量と胃排出時間の減少を改善した。グレリン受容体（GHS-R）阻害薬（D-Lys3）GHRP-6の前処理は、六君子湯の効果を抑制した。

結論：六君子湯は、SSRIによって誘発した胃・十二指腸の空腹期運動の低下および摂餌量、胃排出時間の減少を改善することが明らかとなった。その作用機序として、血漿アシルグレリンの増加が関与している事が示唆された。

## P-8. 5-HT<sub>4</sub>受容体作用薬モサプリドはモルモット直腸切離吻合術により損傷された直腸肛門反射の回復を促進する

<sup>1</sup>奈良県立医科大学医学部生理学第二, <sup>2</sup>奈良県立医科大学医学部分子病理学, <sup>3</sup>奈良県立医科大学医学部消化器・総合外科学

松吉 ひろ子<sup>1</sup>, 國安 弘基<sup>2</sup>, 奥村 雅代<sup>1</sup>, 三澤 裕美<sup>1</sup>, 勝井 錬太<sup>3</sup>, 高木 都<sup>1</sup>

【目的】排便反射は直腸収縮反射（R-R反射）とそれと同時に起こる内肛門括約筋弛緩反射（R-IAS反射）とにより構成されている。モサプリド（M）は選択的5-HT<sub>4</sub>受容体作動薬として主に上部消化管に対する運動促進剤として使用されている。本研究では、下部消化管である直腸の切離吻合術により損傷されたR-IAS反射のMによる回復促進作用とそのメカニズムの解明を行った。【方法】ネブタール麻酔下でモルモットの直腸を切離後吻合し、その吻合部にM（10 μM）、5-HT<sub>4</sub>受容体遮断薬GR113808（GR；10 μM）とM（10 μM）、または溶媒（0.2% DMSO）を局所投与した。これらの処置後1-8週間、ウレタン麻酔をしたモルモットに対してR-R反射とR-IAS反射を記録した。終了後、吻合部を含む直腸組織を採取し、免疫組織学的手法を用いて壁内神経の再生過程を調べた。さらに、術後のM局所投与に加えBrdUを2週間経口摂取させたモルモットの直腸吻合部組織を神経標識物質NFや神経幹細胞標識物質DLX2で免疫染色し、壁内神経細胞の再生過程を調べた。【結果】溶媒局所投与群においては、術後8週間で反射経路の修復によるR-IAS反射の回復が認められた。これに対しM局所投与群では、術後2週間で反射経路の修復によるR-IAS反射の回復が認められた。さらに、この反射経路の修復とR-IAS反射の回復はGR同時投与により阻害された。一方、吻合部肉芽組織においては、術後1-2週間は、DLX2陽性細胞の増加が認められ、2週目にはBrdUに標識されたNF陽性細胞のネットワーク形成も認められた。これらの反応もまたGRにより阻害された。【結論】MによるR-IAS反射経路修復とR-IAS反射の回復ならびに吻合部肉芽組織における神経幹細胞からの壁内神経細胞再生は、壁内神経の5-HT<sub>4</sub>受容体の活性化を通じて起こったと考えられる。



## P-9. Mefloquine はギャップ結合機能を調べる研究の良いツールとなる

<sup>1</sup>名古屋市立大学看護学部生理学, <sup>2</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学

山本 喜通<sup>1,2</sup>, 鈴木 光<sup>2</sup>

特定のコネクシン (Cx36 又は Cx50) から構成されるギャップ結合を選択的に遮断するとされている mefloquine の作用を, Cx40 および Cx43 が発現しているモルモット腸間膜動脈内皮細胞層の単離標本に conventional whole-cell clamp 法を適用して研究した. 内皮細胞同士は豊富なギャップ結合により電氣的に連絡しており, その中の 1 個の細胞に適用したパッチ電極では標本全体の膜電位制御は不可能であった. Mefloquine 40  $\mu$ M を投与すると 3 分程度で電極から見た入力抵抗が極めて増加し, 標的細胞の膜電位固定が可能となった. これまで使われてきた多くのギャップ結合遮断薬は膜を脱分極させるが, mefloquine は単離内皮細胞を 10 mV 程度過分極させた. 電位固定下にアセチルコリン (1  $\mu$ M) を投与すると, カリブドトキシン感受性の電流が観察されたが, その逆転電位は -120 mV より負側に存在した. 過分極の機序は不明であるが, ギャップ結合を遮断することによって細胞本来の膜電位に戻ったとも考えられる. 以上の様に, 培養細胞の Cx36 又は Cx50 に使われたもウドより高濃度を要するとはいえ, 脱分極といった副作用のない mefloquine はギャップ結合研究の有用なツールとなると考えられる.

## P-10. ブタ冠動脈において内皮細胞除去は Ca チャネル依存性の収縮反応を引き起こす

<sup>1</sup>文京学院大学保健医療, <sup>2</sup>シンシナティ大学医学部分子細胞生理

石田 行知<sup>1</sup>, 坂井 泰<sup>1</sup>, Richard Paul<sup>2</sup>

血管内皮の障害は血管攣縮の一つの原因である. ブタ冠動脈において内皮を除去した直後に一過性収縮が発生する. この収縮反応の発生機構を検討した. 【方法】ブタ心臓から摘出した冠動脈 (左回旋枝) から幅 2 mm のリング標本作製し, Krebs 液中に浸し, 張力トランスデューサを介して収縮反応を等尺性に記録した. 内皮細胞除去標本は, 血管標本を軽くこすり, 血管内壁を外側に向かって反転させることにより作製した. 【結果および考察】内皮を除去後, 直ちにリング標本に張力を負荷すると, 持続時間約 30 分の一過性の収縮が観察された. これに対し, 内皮が正常な標本では張力を負荷しても顕著な収縮反応は観察されなかった. 内皮除去による一過性の収縮が経過した後に再び伸展を加えても, また再び血管壁を摩擦しても, 張力発生は観察されなかった. これらのことから, 伸展や摩擦の平滑筋細胞への力学的な刺激が収縮反応の引き金ではなく, 内皮細胞の破壊に伴う何らかの刺激が平滑筋細胞収縮の原因であると考えられる. この収縮は, 低酸素 (95% N<sub>2</sub> 通気) により抑制されたことから, アクティブな反応である. 細胞外 Ca<sup>2+</sup> 除去により, また, Ca チャネル拮抗薬 diltiazem 10  $\mu$ M 存在下で, この収縮反応は消失した. 外液に高濃度 Mg<sup>2+</sup> (10 mM) が存在することによっても収縮反応は抑制された. 一方, 活性酸素消去薬 N-acetyl-L-cystein (5 mM) 存在下では収縮反応は抑制されなかった. 以上の結果から, 内皮破壊により活性酸素以外の何らかの刺激が生じ, 脈平滑筋の Ca チャネルが活性化され, 冠動脈が一過性に収縮することが示唆され, さらに Ca 拮抗薬や Mg<sup>2+</sup> などが塗布されているステントの血管攣縮予防の実験的根拠を示唆している.

## P-11. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット摘出心灌流圧標本における収縮反応性の変化

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室

小澤 遊太, 松本 貴之, 小林 恒雄, 鎌田 勝雄

【目的】糖尿病時における血管機能障害に関しては、種々の血管標本において検討されているが、冠血管全体の機能変化に関する検討は少ない。そこで、我々は、糖尿病時における冠血管全体の機能変化を測定するため、ランゲンドルフ法を用い、冠血管床の圧変化に対して検討を行った。【方法】ストレプトゾトシン (STZ) を投与し、9ヶ月経過した糖尿病ラット及び同週齢の対照の Wistar ラットの心灌流標本における KCl, ACh, endothelin-1 (ET-1), calcium-channel activator (Bay K 8644) の反応を圧トランスデューサーを用いて灌流圧の変化として検討を行った。【結果】Wistar 群と比較し、STZ 群において、KCl, ACh, ET-1 による冠血管圧変化は、最大反応は減弱していたが、低濃度における圧上昇は、STZ 群において有意に増大していた。Bay K 8644 による圧上昇は、STZ 群において有意に増大していた。また、圧上昇に影響を及ぼさない濃度の Bay K 8644 存在下における ACh の反応性は、両群で増強していたが、STZ 群で特に顕著であった。【考察】本研究によって、長期的に罹患した糖尿病時においては、冠血管において収縮反応性が増大し、これには、voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel が関与していることが明らかとなった。

## P-12. ウシ毛様体滑筋におけるムスカリン受容体刺激による低コンダクタンス陽イオンチャネルの活性化と $\text{Ca}^{2+}$ 貯蔵枯渇との関連性

旭川医科大学生理学講座自律機能分野

宮津 基, 荻野 大, 石居 信人, 高井 章

【目的】毛様体筋の収縮持続相は細胞外からの持続的  $\text{Ca}^{2+}$  補充を必要とするが、そのための  $\text{Ca}^{2+}$  流入経路としては  $\text{M}_3$  型ムスカリン受容体刺激に応じて開口する 2 種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35 pS) と NSCCS (100 fS)] が主要な役割を演ずる。しかし、 $\text{M}_3$  受容体からの信号がチャネルに至る経路については不明である。今回、筋小胞体 (SR) の  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵の枯渇の関与を検討するため、ウシ毛様体筋におけるカフェインの効果を調べた。また、SR の  $\text{Ca}^{2+}$  センサーとして注目される STIM1 と、陽イオンチャネルの分子本体として注目される Orai1 の発現を検討した。

【方法】酵素処理で単離したウシ毛様体筋細胞を用いた。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は Fluo-4 蛍光法により測定した。全膜電流の記録は電位固定法によった。RT-PCR 法と免疫蛍光顕微鏡法とにより STIM1 と Orai1 の発現と局在を検討した。

【結果と考察】カフェイン (5-20 mM) の細胞外灌流とともに、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  はピーク状に上昇し、30 秒以内にプラトー相に移行した。細胞外液  $\text{Ca}^{2+}$  除去後も前者は観察されたが、後者は消失した。-50 mV の膜電位固定下でのカフェイン灌流は持続的な内向き電流を惹起したが、ノイズ解析により、この電流が NSCCS のみの開口によるものであることがわかった。筋組織における RT-PCR により、Stim1, Orai1 の全長 mRNA を検出した。ジギトニン処理後の筋細胞に STIM1 と  $\text{IP}_3$  受容体に特異的に結合する抗体を用いて 2 重免疫蛍光染色を施すと、両蛋白が細胞内に球状に共局在することがわかった。以上の結果は、ウシ毛様体筋のムスカリン刺激による NSCCS 活性化に SR の  $\text{Ca}^{2+}$  枯渇によって生ずる何らかの信号が関与することを示唆する。その過程における STIM1 と Orai1 の関与に興味を持たれる。

### P-13. ヒト子宮内膜脱落膜化過程における間質細胞 TRPC1 を介した $\text{Ca}^{2+}$ 流入の役割

<sup>1</sup>福岡大学医学部生理学, <sup>2</sup>福岡大学医学部産婦人科

瓦林 靖広<sup>1</sup>, 海 琳<sup>1</sup>, 井上 善仁<sup>2</sup>, 井上 隆司<sup>1</sup>

【目的】間質細胞は筋線維芽細胞の一種であり, 性ホルモン (E2, P4) や炎症性サイトカイン ( $\text{TNF}\alpha$ ) などの刺激によって細胞の形態や機能が大きく変化する (形質転換)。その変化は, 受精卵の着床, 子宮内膜の脱落膜化による妊娠の維持などと密接に関連しているが, その分子機序については殆ど知られていない。本研究では, 種々の物理化学刺激によって活性化され, 細胞の増殖や形質転換に関わっていることが明らかとなってきた電位非依存性  $\text{Ca}^{2+}$  流入チャネル群 TRP 蛋白質に着目し, 間質細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  動態変化を介した形質転換の分子機序を探索した。

【方法】成人女性から採取した子宮内膜標本から酵素的に単離した間質細胞を一次培養して用いた。RT-PCR 法, real-time PCR 法, ウェスタンブロット法で mRNA, 蛋白質の発現を検討した。更に, fura-2 によるデジタル蛍光イメージング法で細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態を観察した。(結果)RT-PCR 法で9種の TRP アイソフォーム (C1,C4,C6,V2-V4,M3,M4,M7) の発現が確認された。子宮内膜の脱落膜化促進作用のある E2/P4 で約 2 週間処置すると, TRPC1,TRPC4 の発現増加がみられた。これに伴って, 間質細胞は巨大な敷石状の形態変化を起こし, 脱落膜化マーカー IGFBP1, プロラクチンの著明な発現増加がみられた。これらの変化は  $\text{TNF}\alpha$  の添加 (24 時間) によって拮抗された。E2/P4 処置は, basal  $\text{Ca}^{2+}$  流入, ストア枯渇活性化  $\text{Ca}^{2+}$  流入を数倍に増加させた。これとは逆に, siRNA 法によって TRPC1 の発現増加を特異的に抑制し  $\text{Ca}^{2+}$  流入を減少させると, IGFBP1 の増加抑制に伴って, 脱落膜化に特有な形態変化が強く抑制された。

【結論】以上より, 性ホルモンは間質細胞の TRPC1 蛋白質の発現増加を介して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を増加させ, 脱落膜化に伴う間質細胞の形質転換を促進していることが強く示唆された。

### P-14. ミオシン II 阻害薬プレバスタチンがスキンド気管平滑筋収縮に与える影響

<sup>1</sup>東京慈恵会医科大学麻酔科学講座, <sup>2</sup>東京医科大学細胞生理学講座

湯本 正寿<sup>1,2</sup>, 渡辺 賢<sup>2</sup>

【目的】ミオシン II 阻害薬プレバスタチンは, 相性平滑筋収縮をミオシン調節軽鎖リン酸化に影響を与えることなく抑制する。我々は, 緊張性平滑筋であるモルモット気管平滑筋においても同様の収縮抑制効果をプレバスタチンが持つことをスキンド標本実験から明らかにした (湯本ら, 第 50 回日本平滑筋学会)。しかし気道平滑筋スキンド標本では, 高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  負荷によっても最大収縮張力の数割の収縮張力しか出現しない。そこで今回は, GTP アナログ  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  で感作し, 収縮張力を増大させたスキンド標本の収縮張力およびミオシン調節軽鎖リン酸化量に対するプレバスタチンの効果を調べ, 標本非感作時のプレバスタチン効果と比較検討した。【方法】モルモット気管平滑筋に  $\beta$ -エスシン及び  $\text{Ca}$  イオノフォア A23187 処理を行い, 細胞膜を介した情報伝達系が残存した状態のスキンド標本を作製した。100  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}\gamma\text{S}$  感作下で収縮張力- $\text{Ca}^{2+}$  濃度関係に対するプレバスタチンの影響を調べた。また, 力学応答測定後に標本を TCA 固定し, ミオシン軽鎖のリン酸化のレベルをウェスタンブロット法にて評価した。【結果】100  $\mu\text{M}$  の  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  を前処置した標本は収縮の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性と  $\text{Ca}^{2+}$  活性化最大収縮張力を共に増加し, それに伴ってミオシン軽鎖リン酸化量も増加した。プレバスタチンはミオシン軽鎖リン酸化量に影響を与えることなく収縮張力を顕著に抑制した。【結論】 $\text{GTP}\gamma\text{S}$  による収縮タンパク質系の感作は, プレバスタチンのスキンド気管支標本収縮抑制効果に影響を与えない。同様の結果はホスファターゼ阻害薬 tautomycin 負荷に伴う収縮でも得られた。従って, ミオシン調節軽鎖が十分リン酸化されており, おそらくアクチン: ミオシンの大多数が相互作用をしている状態においても, プレバスタチンはミオシンに直接作用する事で収縮を抑制する事が示唆された。

## P-15. げっ歯類の気道および消化管平滑筋の緊張性におよぼす硫化水素の影響

近畿大学薬学部医療薬学科病態薬理学研究室

関口 富美子, 久保 聡子, 黒河 祐子, 岡本 由佳梨, 土江位 知子, 川畑 篤史

【目的】毒ガスの硫化水素 ( $\text{H}_2\text{S}$ ) は近年, NO や CO に続く第3の生体内ガス性情報伝達物質として機能していることが示されている. 本研究では, げっ歯類の気道および消化管平滑筋標本を用いて, 平滑筋緊張性に対する  $\text{H}_2\text{S}$  の影響とそのメカニズムについて検討を行った. 【方法】ウレタン麻酔下, 脱血致死させたモルモット, ラット, マウスより, 気管, 気管支, 胃, 回腸, 空腸, 結腸, 盲腸ヒモ, オッディ括約筋を摘出し, 等尺性張力を測定した. 弛緩反応は, carbachol (CCh) で前収縮させた標本に  $\text{H}_2\text{S}$  ドナーである NaHS を累積的に作用させて観察した. 【結果】本研究で用いたいずれの標本においても, NaHS は 0.01~3 mM の範囲で濃度依存性弛緩反応を示した. その最大弛緩率は大部分の標本において CCh 収縮の 70% 程度であったが, モルモット気管支では 20% 未満であった. 血管平滑筋における NaHS 弛緩に関与が示唆されている ATP 感受性  $\text{K}^+$  ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) チャネルの阻害薬 glibenclamide 10  $\mu\text{M}$  は, いずれの標本においても NaHS 弛緩反応に対して阻害効果を示さなかった. マウス気管支における NaHS 弛緩反応についてさらに弛緩メカニズムを検討するため,  $\text{NK}_1$  および  $\text{NK}_2$  受容体, 可溶性グアニル酸シクラーゼ, COX-1 および COX-2 の阻害薬の効果を検討したが, いずれの阻害薬も NaHS による弛緩反応を阻害しなかった. 哺乳類の生体内において  $\text{H}_2\text{S}$  の前駆体である L-cysteine, および代謝産物の1つである  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  はいずれもマウス気管支を弛緩させなかった. 【結論】本研究で用いた標本における NaHS 弛緩反応はいずれも  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャネル非依存性であること, さらにマウス気管支の NaHS 弛緩に, 内因性の neurokinins, NO, prostaglandins の関与はないことが示された.

## P-16. MYH9 異常症 6 症例の遺伝子解析

<sup>1</sup>北里大学医学部血液内科学, <sup>2</sup>名古屋医療センター臨床研究センター

青木 卓巳<sup>1</sup>, 宮崎 浩二<sup>1</sup>, 國島 伸治<sup>2</sup>, 東原 正明<sup>1</sup>

背景: MYH9 異常症は, 巨大血小板減少に好中球細胞質の封入体を特徴とし, 腎障害や感音性難聴, 白内障などの随伴症状を有することもある遺伝性疾患である. 非筋ミオシン IIA 重鎖遺伝子 (MYH9) の変異異常が, その原因であるが, その変異部位と臨床所見との関連等については, 未だ不明な点が多い. これまでに, 我々は, MYH9 の 3 種の点突然変異を持つ May-Hegglin 異常症 5 症例と, まれな欠失変異を認める 2 症例を経験したので, 免疫染色の解析や臨床所見の特徴も含め報告する. 結果: 症例 1~3: E1841K 変異症例の 1 家系. 母と二人の娘の末梢血塗沫標本を抗ミオシン抗体にて免疫蛍光染色したところ, ほとんどの好中球に 1~2 個の大型の細胞質封入体が強く染色された. また, 同時にアクチン線維を phalloidin 染色で, その封入体の中心部分が染まった. 症例 4: R1165C 変異症例. 症例 5: D1424N 変異症例. 症例 6: 21 歳男性. 健診で血小板減少を指摘された. 出血傾向はなく, 腎障害, 視覚, 聴覚に異常を認めなかった. 巨大血小板を認め, 好中球細胞質の大型紡錘形の封入体は, 抗ミオシン抗体で染色された. MYH9 の Exon24 に 1083 番グルタミン酸の 1 アミノ酸欠失を認めた. 症例 6: 46 歳男性. 出血傾向はないが, 両側の感音性難聴, 白内障, 蛋白尿を認めた. 巨大血小板と, 小型の好中球細胞質封入体を数個認め抗ミオシン抗体で染色された. MYH9 の Exon24 に 1063-1069 までのアミノ酸が欠失していた. 考察: これまでの MYH9 異常症の報告では, MYH9 遺伝子の点突然変異によるものがほとんどであり, 欠失変異に関しては, inframe 欠失変異は, これまでに Exon26 と Exon24 にそれぞれ認められた 2 例の報告のみであり, 今回の 2 症例は, いずれも新規の変異例である. 6 症例の免疫染色所見や臨床所見についても比較検討した.



## P-17. 糖尿病モデルラットにおける胃底部平滑筋収縮弛緩反応の変化

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学

溝口 達也, 鬼頭 佳彦, 鈴木 光

【目的】糖尿病性胃腸症では腹部膨満感, 嚥下障害, 悪心, 嘔吐, 腹痛, 便秘, 下痢などの多彩な消化器症状が出現し, 患者の QOL を著しく低下させることが報告されている。胃底部の弛緩 (胃適応性弛緩) は, 内容物の攪拌, 排出といった胃全体としてのスムーズな協調運動を誘発させるという重要な役割を果たしているが, 糖尿病が胃適応性弛緩に及ぼす影響については不明な点が多い。本研究はこれらの背景に基づき, 自然発症 II 型糖尿病モデルラットである GK ラットの胃底部平滑筋収縮弛緩反応について調べた。【方法】10~15 週齢の正常ラット (Wistar ラット) 及び GK ラットから胃底部輪走筋標本を作製し, 収縮張力を等尺性に記録した。【結果】静止状態において GK ラットでは正常ラットではみられない自動運動が観察された。経壁神経刺激 (TNS; 300  $\mu$ s, 10 Hz, 3~30 pulses) による収縮は GK ラットで有意に大きく, ニトロアルギニン (L-NA; NO 合成酵素阻害剤) 投与により収縮が増大するとともに有意差は消失した。また, TNS 誘発収縮はアトロピンにより抑制された。カルバコール (CCh) 投与により発生した収縮の持続相において, 正常ラットでは規則的な自動運動が観察されたのに対し, GK ラットでは一過性の弛緩反応を伴う不規則な自動運動がみられた。CCh 存在下で TNS を行うと, 刺激回数依存的に弛緩反応が大きくなった。TNS によって誘発される弛緩反応の振幅, 持続時間はともに L-NA で抑制されたが, L-NA による抑制率は GK ラットで有意に低下していた。【考察】NO 神経は胃適応性弛緩に関与していることから, その機能低下は胃貯留能の障害をもたらす, 結果的に胃排出能を遅延させられると思われる。従って, GK ラットで観察された胃底部における NO 神経の機能低下は糖尿病性胃腸症の原因の一つである可能性が示唆された。

## P-18. 5HT-4 神経刺激による筋層部マクロファージ $\alpha$ 7-nicotinic acetylcholin 受容体を介した消化管炎症抑制作用

<sup>1</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室, <sup>2</sup>東京大学大学院医学系研究科消化管外科学・代謝内分泌外科学

堀 正敏<sup>1</sup>, 土田 泰昭<sup>1,2</sup>, 畑尾 史彦<sup>2</sup>, 瀬戸 泰之<sup>2</sup>, 村田 幸久<sup>1</sup>, 尾崎 博<sup>1</sup>

【背景】5-HT<sub>4</sub> 受容体選択的作動薬であるクエン酸モサプリド (cMOS) は胃腸の壁内神経に作用して胃や腸の運動機能を改善する gastroprokinetic agent である。我々は, 開腹手術後に生じる腸麻痺に対するクエン酸モサプリドの有効性の有無について検討したところ, cMOS が術後の炎症応答を抑制することで腸麻痺を改善することを見いだした。

【目的】本研究では, 術後腸麻痺に対するクエン酸モサプリドの抗炎症作用機序を解明することを目的とした。【方法】SD ラット (7~9 週齢, 雄) を麻酔下で開腹し, 滅菌済みの綿棒にて回腸遠位部を擦り術後腸麻痺モデル (Postoperative ileus; POI) を作製し, 手術 24 時間後に回腸を採取した。cMOS は手術前後に 3 回皮下投与した。【結果】POI 群において回腸輪走筋の CCh による収縮は顕著に低下し, 筋層間および漿膜下層には多数のマクロファージと好中球の浸潤が認められた。CCh 収縮の抑制は NO 合成酵素阻害剤の前処置により顕著に回復した。cMOS の投与は POI によるマクロファージと好中球の筋層部への浸潤を顕著に抑制し, CCh 収縮の減弱を有意に回復させた。この cMOS の抗炎症作用は, hexametonium ならびに  $\alpha$ 7nicotinic receptor ( $\alpha$ 7nAChR) 阻害剤である methyllycaconitine citrate (MLA) 処置によって消失した。【考察】術後腸麻痺モデルラットの回腸では, 筋層部にマクロファージと好中球が浸潤し, これらの炎症性細胞から放出される NO によって回腸平滑筋の収縮が抑制されて腸麻痺を生じることが示唆された。cMOS は 5-HT<sub>4</sub> 神経を介して壁内神経叢からの ACh 遊離を促し, これがマクロファージの  $\alpha$ 7nAChR を活性化して抗炎症作用をもたらす, 腸麻痺を改善すると考えられた。