

ポスターディスカッション

P-1 The effects of imatinib mesylate on spontaneous activity in the guinea - pig prostate

¹Medicinal Chemistry and Drug Action, Monash Institute of Pharmaceutical Sciences, Monash University, Parkville, Victoria, 3052, Australia, ² Department of Physiology, Monash University, Clayton, Victoria, 3168, Australia

M Lam¹, A Dey¹, RJ Lang² and B Exintaris¹

Benign prostatic hyperplasia is a common disease amongst aging men that can result in lower urinary tract symptoms due to an enhanced prostatic smooth muscle tone. Spontaneous contractions generated by pacemaker cells similar to interstitial cells of Cajal (ICCs)-termed prostatic interstitial cells (PICS)-have been identified in the human and guinea-pig prostate and are likely to be responsible for the tone of the prostate. c-Kit, a proto-oncogene that encodes a tyrosine kinase receptor, is commonly found on ICCs and has also been identified on PICS. This study aimed to investigate the effect of imatinib mesylate, a tyrosine kinase receptor inhibitor, in the generation of spontaneous electrical and contractile activity on the guinea-pig prostate. Standard tension recording and microelectrode techniques were used on preparations of the mature guinea-pig prostates (750-850 g); imatinib mesylate was used at 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M and 50 μ M.

At 1 μ M-10 μ M, imatinib mesylate did not significantly affect spontaneous slow wave activity in the prostate. However, the highest concentration, 50 μ M, significantly reduced the amplitude of slow waves from 56.95 ± 2.49 mV to 49.6 ± 3.38 mV ($P < 0.05$, $n=5$) after a drug incubation of 30 min. In contrast, spontaneous contractions were reduced at all concentrations. Imatinib mesylate gradually suppressed the amplitude and slowed the frequency of control contractions to 0% and 0% at 1 μ M ($n=8$); 23.1% and 21.4% at 5 μ M ($n=7$); 77.8% and 54.5% at 10 μ M ($n=9$); 72.7% and 43.3% at 50 μ M ($n=9$), respectively. The effects of imatinib mesylate on spontaneous contractions are concentration-dependent; however, slow wave activity appears to be less affected by the drug. This implies that imatinib mesylate may not only affect PIC activity in the guinea-pig prostate.

P-2 X線小角散乱による平滑筋・筋フィラメント格子動態解析の試み (第2報)

¹首都大学東京・健康福祉学部, ²東京医大, ³文京学院大学, ⁴慈恵医大, ⁵JASRI/SPring-8

○渡辺 賢^{1,2}, (東京医大), 石田 行知³ (文京学院大学), 木村 雅子⁴, 田口 美香⁴, 竹森 重⁴, 湯本 正寿⁴, 山口 真紀⁴ (慈恵医大), 八木 直人⁵

【緒言および目的】 平滑筋の収縮フィラメント構造動態を探るため、我々はモルモット盲腸紐β-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分析を解析ソフトウェア MATLAB を用いて行った。

【結果と考察】 全ての実験条件で、(a) 11.4 nm にピークを持つ既知の赤道反射以外に、(b) 50-80 nm, (c) 20 nm, (d) 14 nm, 付近にピークを持つ赤道反射が同定された。そしてこれらのうち (b) 以外の赤道反射の反射強度や位置は、収縮・弛緩などのスキンド筋標本の状態変化により変化した。

以上の結果は、4つの赤道反射のうち少なくとも3つの反射が筋収縮フィラメントの作る格子状配列に由来すること、又その強度・位置の変化はクロスブリッジ形成などの筋フィラメント動態を反映していることを強く示唆する。赤道反射の由来、またこれらの反射強度の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が存在し、収縮・弛緩・硬直サイクルによる構造変化を赤道反射解析により経時的に追跡可能と考えた。

P-3 2型糖尿病モデル胸部大動脈におけるインスリンシグナルと Src/Pyk2/PDK1/Akt 経路の関与

星葉大・医薬研・機能形態

○根本 真吾, 小林 恒雄, 田口 久美子, 松本 貴之, 鎌田 勝雄

インスリン (Ins) は血糖降下作用の他, NO 合成酵素 (NOS) を活性化し NO を産生することによって, 血管平滑筋を弛緩することが知られている. 近年, NOS の活性化に Src や proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) といった非受容体型チロシンキナーゼの関与が報告されているが, 2 型糖尿病時において詳細は明らかにされていない. そこで今回我々は 2 型糖尿病モデルである Goto-Kakizaki (GK) ラット胸部大動脈における Ins 弛緩反応の変化と, Ins シグナルカスケードにおける Src, Pyk2 の関与について PDK1/Akt pathway に焦点を絞って検討を行った. 正常血管において Ins 刺激は, Tyr579-p-Pyk2, Tyr416-p-Src, Ser241-p-PDK1, Thr308-p-Akt, Ser1179-p-eNOS の増加を生じた (vs 無刺激). 一方, 糖尿病群においては Ins 刺激による上記タンパク質リン酸化レベルの低下, NO 産生および血管弛緩反応の減弱が認められた (vs 正常動物). また Src 阻害薬である PP2 を用いたところ, 正常動物において Ins 刺激による Tyr416-p-Src, Ser241-p-PDK1, Thr308-p-Akt, Ser1179-p-eNOS のリン酸化レベルおよび NO 産生, 血管弛緩反応は有意に抑制されたが, Tyr579-p-Pyk2 に影響は見られなかった (vs 未処置). 以上のことから Ins 刺激による NO 産生に Src, Pyk2 の関与が示唆され, PDK1/Akt/eNOS pathway の上流に Src, さらにその上流に Pyk2 が位置している可能性が示唆された. さらに 2 型糖尿病時, Ins 刺激による NO 産生の低下に Pyk2/Src/PDK1/Akt/eNOS pathway の減弱が関与していることが示唆された.

P-4 TXA2 安定誘導体の持続性血管収縮に対する多価不飽和脂肪酸の抑制効果の比較

¹東邦大・薬・薬理, ²千葉大院・医・分子生体制御

○佐藤 恭輔¹, 重松 舞衣¹, 柴田 さゆり^{1,2}, 通川 広美¹, 田中 芳夫¹

【目的】我々は以前, ω -3 系多価不飽和脂肪酸の一つであるドコサヘキサエン酸 (DHA) の血管に対する作用を検討する過程で, DHA がモルモット胸部大動脈の U-46619 (TXA₂ 安定誘導体) による持続性収縮を強力に抑制することを報告した. 本研究では, ラット大動脈で検討することにより, DHA による収縮抑制効果をさらに検証するとともに, DHA と同様 ω -3 系に分類されるエイコサペンタエン酸 (EPA) や, ω -6 系不飽和脂肪酸 (arachidonic acid ; AA, linoleic acid ; LA) の効果についても検討した.

【方法】内皮を除去したラット胸部大動脈リング標本 (幅 2 mm) を実験に供した. U-46619 による持続性収縮が得られた後に投与した各種多価不飽和脂肪酸 (DHA, EPA, AA, LA) の影響を等尺性に記録した. また, phenylephrine (Phe) や high-K, PGF_{2α} による収縮に対する影響も検討した.

【結果】① DHA は, U-46619 による収縮のほか, PGF_{2α} による持続性収縮に対しても強い抑制を示したが, Phe や high-K による持続性収縮に対しては抑制を示さなかった. ② U-46619 による持続性収縮に対する抑制効果は, EPA によってももたらされたが, 抑制の程度は DHA よりも弱かった. ③ ω -6 系不飽和脂肪酸のうち, LA は U-46619 の持続性収縮をほとんど抑制しなかったが, AA は DHA よりも高濃度で抑制作用を示した.

【考察】DHA は, ラットにおいても, エイコサノイドによる血管収縮を著明に抑制することが明らかとなり, これが DHA の循環保護効果の一端を担う可能性が強く示された. U-46619 の収縮作用に対する抑制効果は EPA や AA によってももたらされたが, DHA の抑制効果のほう明らかに強力であったため, 本不飽和脂肪酸に特異的な機序の関与が示唆された.

P-5 ラット腸間膜動脈平滑筋の弛緩反応には、プロプラノロール (Prop) 感受性ならびに非感受性の 2 種類の β -アドレナリン受容体 (β -ADR) が関与する

¹東邦大・薬・薬理, ²千葉大院・医・分子生体制御

○重松 舞衣¹, 柴田 さゆり^{1,2}, 佐藤 恭輔¹, 通川 広美¹, 粕谷 善俊², 田中 芳夫¹

【目的】 当教室ではこれまで、ラット大動脈の β -ADR の薬理学的性質を検討し、胸部では β_2 、腹部では β_1 が主たる β -ADR であること、胸部・腹部のいずれにおいても Prop 非感受性 β -ADR (β_3) が有意に寄与することを報告してきた。本研究では、 β -ADR の発現と部位特異性の関連性をさらに追究する目的で、腸間膜動脈を用いた検討を行った。

【方法】 Wistar 系雄性ラットの腸間膜動脈の内皮除去標本 (ラセン標本) を実験に供し、カテコラミンの濃度反応曲線に対する各種 β -ADR 遮断薬の影響を Schild plot 解析した。

【結果】 ① pD_2 値を基にしたカテコラミンの効力順位はイソプレナリン (ISO) > アドレナリン \approx ノルアドレナリンの順となり、 β_1 -ADR に対する順位と一致した。② ISO の濃度反応曲線は、Prop ($3 \times 10^{-9} - 10^{-8}$ M) により競合的に拮抗されたが、これより高濃度の Prop によってはそれ以上影響を受けなかった。③ ISO の濃度反応曲線は、ICI-118,551 (3×10^{-8} M) 存在下におけるアテノロール ($10^{-7} - 3 \times 10^{-7}$ M), ICI-118,551 ($10^{-7} - 3 \times 10^{-7}$ M) によって競合的に拮抗され、 pA_2 値はいずれも β_1 -ADR に対する値と一致した。④ 高濃度 ($\geq 3 \times 10^{-7}$ M) のブプラノロール (Bup) は、Prop (10^{-7} M) 存在下における ISO の濃度反応曲線に競合的に拮抗したが、算出された pA_2 値はこれまでの報告値よりも大きな値であった。

【考察】 ラット腸間膜動脈の β -ADR は、胸部・腹部大動脈と同様、Prop 感受性 β -ADR と Prop 非感受性 β -ADR に分類されることが示された。Prop 感受性 β -ADR は主として β_1 であるが、Prop 非感受性 β -ADR は β_3 と推定されるものの、胸部・腹部大動脈の β_3 とは性質が異なる可能性が示唆された。

P-6 新規子宮収縮抑制剤 bedoradrine (KUR-1246) の経胎盤移行および乳汁移行について

¹国家公務員共済組合連合会浜の町病院産婦人科, ²キッセイ薬品工業・創薬研究部, ³福岡大学医学部産婦人科

○井上 善仁¹, 小林 護², 瓦林 達比古³

【目的】 新規子宮収縮抑制剤 bedoradrine (KUR-1246) の有効性および安全性を評価する目的で、その子宮収縮抑制効果、経胎盤移行・乳汁移行を動物実験で検討した。

【方法】 Sprague-Dawley (SD) ラット (妊娠 21 日) に bedoradrine ないしは ritodrine を持続静脈内投与した際の子宮収縮抑制効果を比較した。SD ラット (妊娠 21 日) と Hartley 系モルモット (妊娠 49 日) に bedoradrine ないしは ritodrine を静脈内投与した後に母体血および胎仔血を採取し、各々の薬剤濃度を liquid chromatography-tandem mass spectrometry 法によって測定し移行率を算出した。さらに産褥 1 日目の SD ラットで bedoradrine を単回投与後経時的に血清中、乳汁中の濃度を測定した。

【結果】 bedoradrine, ritodrine の子宮収縮抑制反応の ED₅₀ 値 (50% 有効濃度) は各々 1.1 μ g/kg/min, 42.9 μ g/kg/min であり、bedoradrine は ritodrine より約 40 倍低い濃度で子宮収縮を抑制した。bedoradrine と ritodrine のラットおよびモルモットにおける胎児への移行率は $5.3 \pm 0.3\%$, $1.6 \pm 0.1\%$ および $8.3 \pm 1.0\%$, $5.4 \pm 0.7\%$ であり bedoradrine の方が低い傾向にあった。単回投与された bedoradrine は投与 48 時間後には乳汁中に検出されない程度まで減少した。

【結論】 bedoradrine は ritodrine より強い収縮抑制効果と低い胎児移行性を有しており、また乳汁中への移行も低いことからより安全で有効な切迫早産治療薬となり得る。

P-7 ウシ毛様体筋のムスカリン受容体作動性低コンダクタンス陽イオンチャネル活性化に対する Ca^{2+} 貯蔵枯渇の効果

旭川医大・生理学・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 Ca^{2+} 補充を必要とするが、そのための Ca^{2+} 流入経路としては 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、 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 Ca^{2+} 貯蔵の枯渇の関与を検討するため、ER Ca^{2+} ポンプ阻害薬である thapsigargin (TG) と ER Ca^{2+} の放出薬 caffeine の効果について調べた。

【方法】 酵素処理で単離したウシ毛様体筋細胞を用い電位固定法により全膜電流を記録。細胞内 Ca^{2+} の変動は、同じく単離毛様体筋細胞において Fluo-4 蛍光法により記録した。

【結果と考察】 カルバコール (CCh) によって活性化される2種類の非選択性陽イオンチャネルの中で、TG は NSCCS のみの開口を維持させた。カフェイン (5-20 mM) は、一過性の Ca^{2+} 上昇とそれ-に続く持続的な Ca^{2+} 上昇を惹起し、全膜電流測定から NSCCS のみを開口させた。ライアノジン (10 μM) をカフェインと同時に数分間投与すると、両者の除去後もそのまま持続する NSCCS の開口が観察された。RT-PCR 法によりウシ毛様体筋組織から全長の Stim1, Orai1 の mRNA が検出された。毛様体筋細胞をジギトニンで処理したあと、STIM1 の特異抗体を用いて、IP₃ 受容体 1 の特異抗体と2重免疫蛍光染色すると、細胞内に両者が球状に共局在するのが観察された。

これらの知見は、ウシ毛様体筋のムスカリン刺激により活性化される NSCCS は、SR の Ca^{2+} 貯蔵からの Ca^{2+} 放出を介して活性化される可能性を示唆する。

P-8 選択的セロトニン再取り込み阻害薬、フルボキサミンマレイン酸塩の直腸切離吻合後の神経再生作用への影響

奈良県立医科大学 生理学第二講座

○川原 勲, 松吉 ひろ子, 後藤 桂, 張 国興, 小畑 孝二, 高木 都

われわれは、これまでモルモットを用いて排便反射は直腸-直腸収縮反射とそれと同時に起こる直腸-内肛門括約筋弛緩反射により構成されていることを明らかにしてきた。さらに、この排便反射は、中枢神経系、外来性自律神経系と腸壁内神経系とによって調節されていることや、壁内神経系の中でも、特にコリン作動性収縮神経（直腸収縮反射）および NO 作動性弛緩神経（内肛門括約筋弛緩反射）がこの排便反射に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。一方、ヒトの直腸吻合術後における排便機能障害が臨床的には大きな問題となっているが、吻合部狭窄や直腸貯留機能の低下、手術に伴う外来性自律神経切断や肛門括約筋損傷が原因になっている可能性があるが、直腸切離に伴う壁内神経系の切断による排便反射の消失は排便機能障害の重要な原因と考えられる。従って、切断された壁内神経の再生や吻合部位（肉芽組織）での神経新生は排便機能回復に有効である可能性が高い。そこで、われわれは、モルモットの直腸を外来性自律神経は温存して切離吻合後、5-HT₄ 作用薬モサプリドを吻合部に持続的に局所投与することにより、吻合部での腸壁内神経の再生や新生が促進され、直腸-内肛門括約筋反射の回復に要する期間が短縮することを示した。本研究では、神経再生過程を解明する目的で、半周と全周の直腸吻合術を施したラットに飲水または直腸吻合部局所投与によって、選択的セロトニン再取り込み阻害薬であるフルボマレイン酸塩 10-100 μM またはモサプリド 10-100 μM を持続的に作用させ、5-HT₄ 受容体のリガンドであるセロトニンの内因性の増加が神経再生・新生に与える影響をモサプリドの効果と比較検討した。さらに、再生した神経が、コリン作動性神経、NO 作動性神経、セロトニン作動性神経のどれかを明らかにする予定である。

P-9 ラット十二指腸におけるサブスタンス P 免疫陽性ニューロンの特徴

早稲田大学人間科学学術院

○三井 烈, 小室 輝昌

ラット十二指腸で惹起される運動反射や分泌反射において、壁内のサブスタンス P (SP) 含有ニューロンの関与が示唆されている。本研究では、ラット十二指腸の全載伸展標本を用いて免疫組織化学染色を行ない、筋層間神経叢および粘膜下神経叢における SP 含有ニューロンの 1) 形態学的特徴, 2) 全ニューロンに占める割合, 3) マーカートンパク質について検討した。細胞体における SP 免疫陽性反応を増強させるため、コルヒチンを腹腔内投与したラットを用いた。筋層間神経叢では約 3 分の 1 のニューロンの細胞体が SP 陽性であった。これらのうちの多くは大きな卵型または円形の細胞体から 1~4 本の長い突起を伸ばすニューロン (Dogiel II 型ニューロン) で、calretinin および neurofilament 200 にも免疫陽性であった。この形態を示すニューロンは、壁内知覚性ニューロンであるとされている。また calretinin および neurofilament 200 陰性で小さな細胞体をもつ SP ニューロンも観察され、平滑筋を支配する運動ニューロンであると推察された。粘膜下神経叢では、全ニューロンの内の約半数が SP/calretinin/neurofilament 200 陽性であり、これまでに報告したラット遠位結腸での割合 (11%) と比較して非常に高い値であった。これらの一部は双極性や偽単極性の Dogiel II 型ニューロンであった。以上の結果から、ラット十二指腸の筋層間神経叢および粘膜下神経叢には、知覚性と考えられる SP/calretinin/neurofilament 200 陽性 Dogiel II 型ニューロンが存在し、また特に粘膜下神経叢において SP ニューロンの割合が非常に高いことが明らかとなった。これらの形態学的な所見と十二指腸における平滑筋運動などの機能との関連について考察する。

P-10 モルモット近位結腸漿膜下のカハールの介在細胞と縦走筋層との連絡

早稲田大学大学院 人間科学研究科

○玉田 宏美, 小室 輝昌

【目的】 漿膜下のカハールの介在細胞 (ICC-SS) は、漿膜中皮細胞と、縦走筋層との間の狭いスペースに、細長い細胞として存在する。ICC は、従来、平滑筋の運動調節に関わると考えられており、通常、筋層内あるいは筋と密接して観察されることが多く、その点で ICC-SS の分布は特異である。これまでの観察により、この ICC-SS は、水分や電解質の吸収を主な機能とする近位結腸で特に発達しており、管壁の最外層全体に網目構造を構成していることから、近位結腸の管壁の膨潤を感知する一種の伸展受容器として働き、周囲の筋層の収縮を促して、吸収した水分・電解質の輸送を促進するものと推定してきた。そこで、本研究では、この作業仮説を検討する一つとして、ICC-SS と隣接縦走筋との連絡について、形態学的、すなわち、免疫組織化学的観察と、電子顕微鏡観察を行った。【材料と方法】 モルモット回盲部直後の近位結腸を用い、全載伸展標本を作製し、ICC の標識として c-Kit、平滑筋細胞の標識として α -Smooth Muscle Actin、また、神経要素の標識には PGP9.5 抗体を用い、免疫組織化学的検索を行った。また、同部位の組織を樹脂包埋し、超薄切片作製後、電子顕微鏡観察を行った。【結果と考察】 α -Smooth Muscle Actin と c-Kit で二重染色を施した免疫組織化学的観察では、縦走筋層と非常に近接する ICC-SS が、縦走筋層内の ICC (ICC-LM) と層を越えて連絡する様子が、共焦点顕微鏡による立体再構築像から明らかとなった。また、漿膜下層の結合組織中の神経要素の分布は疎であり、ICC-SS との明確な連絡は認められなかった。電子顕微鏡的観察では、ICC-SS が、縦走筋細胞および ICC-LM と、gap junction あるいは peg-and-socket 様の構造で結合していることが判明した。これらの観察をもとに、現在、進行中の検索と合わせて、ICC-SS の推定機能について考察する。

P-11 大建中湯の腸管通過時間に対する影響

¹川崎医科大学 検査診断学（内視鏡・超音波）、²同 内科学（消化管）、³同 総合臨床医学、⁴川崎医療福祉大学 臨床栄養学科

○今村 祐志¹、眞部 紀明¹、鎌田 智有²、楠 裕明³、塩谷 昭子²、井上 和彦³、古川 直裕⁴、
畠 二郎¹、春間 賢²

背景と目的

漢方薬である大建中湯は、術後癒着性イレウスに対する効果や基礎的検討による腸管運動亢進作用が報告されているが、*in vivo*で腸管通過時間を検討した報告は少ない。一方、放射線不透過マーカーを用いることで腸管通過時間が簡便に測定することが可能であると報告されている。

大建中湯の腸管通過時間に対する影響をマーカー法で評価した。

方 法

健常ボランティア6名（男性4名、年齢24～47歳平均31.7歳）に対し、大建中湯15gを1日3回7日間投与し、その前後で大腸通過時間、便性状、排便回数を評価した。

マーカー法はMetcalfらの方法に準じ、第1日目に形状1、第2日目に形状2、第3日目に形状3のマーカーを摂取して第4日目に腹部単純レントゲンを撮影した。レントゲン写真は脊椎、骨盤出口、上前腸骨極を指標に右側大腸、左側大腸、直腸S状部に区分し、それぞれの領域に残存しているマーカーの数から腸管通過時間を算出した。また、ブリストル便性状スケールと排便回数を記録した。

なお、本研究は当施設の倫理委員会の承認を得て施行している。

結 果

排便回数は内服前 1.5 ± 1.2 回、内服後 1.5 ± 0.8 回、ブリストル便性状スケールは内服前 4.8 ± 1.3 、内服後 4.0 ± 0.6 と有意な変化はみられなかった。通過時間は、右側大腸は内服前 9.8 ± 4.9 時間、内服後 7.6 ± 3.7 時間と有意な差はみられなかったが、左側大腸は内服前 15.6 ± 5.7 時間、内服後 8.6 ± 5.3 時間、直腸S状部は内服前 13.4 ± 15.5 時間、内服後 4.6 ± 5.1 時間と有意に短縮しており、全大腸でも内服前 38.8 ± 13.4 時間、内服後 20.8 ± 10.0 時間と有意に短縮していた。

結 論

大建中湯は大腸通過時間を短縮させたが、健常者の便性状や排便回数を変化させることは無かった。