

P-01 ドコサヘキサエン酸 (DHA) の血管収縮抑制効果に対するシトクロム P450 依存性エポキシゲナーゼ代謝産物ならびに BK チャネルの関与の可能性

¹東邦大薬

○青木 美歌¹, 佐藤 恭介¹, 小原 圭将¹, 茅野 大介¹, 田中 芳夫¹

【目的】当研究室では、モルモットとラット胸部大動脈を用いた実験で、DHA が TXA₂ 受容体 (TP 受容体) を介した持続性収縮を特異的かつ著明に抑制することを見出し、その機序の一つとして BK チャネルの活性化が関与することを報告してきた。一方、DHA などの n-3 系多価不飽和脂肪酸は、シトクロム P450 (CYP) 依存性エポキシゲナーゼ (EOX) の基質となることが知られており、近年、その代謝産物が種々の生理反応を引き起こすことが示されている。そこで、今回は、DHA の血管収縮抑制効果に対する CYP 依存性 EOX 代謝産物の関与の可能性と BK チャネルの役割について検討した。【方法】実験には wistar 系雄性ラットの胸部大動脈内皮剥離標本を供し、張力変化を等尺性に記録した。今回は、CYP 依存性 EOX 阻害作用を有する SKF525A を用い、その非存在下または存在下で、U-46619 (TXA₂ 安定誘導体) をはじめとする各種血管収縮薬によりもたらされる持続性収縮に対する DHA の抑制効果を比較した。また、2 mM TEA 存在下でも同様の検討を行い、DHA とその CYP 依存性 EOX 代謝産物の血管収縮抑制作用に対する BK チャネルの寄与を評価した。【結果】1) DHA は、SKF525A の有無に因らず U-46619 による持続性収縮を特異的かつ著明に抑制した。2) SKF525A 非存在下での DHA の収縮抑制効果は 2 mM TEA により消失したが、SKF525A 存在下での DHA の収縮抑制効果は TEA により影響を受けなかった。【考察】TP 受容体を介した血管収縮に対する DHA による抑制効果は、CYP 依存性 EOX 代謝産物を介した成分と EOX 代謝産物を介さない成分からなり、BK チャネルの活性化は CYP 依存性 EOX 代謝産物によりもたらされる可能性が示唆された。

P-02 U46619 による血管張力制御機構の検討

¹名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学, ²Department of Pharmacology, University of Oxford

○高野 博充¹, Kim A Dora², Christopher J Garland², 橋谷 光¹

トロンボキサン A₂ は強力な血管収縮作用を持つ生理活性物質であるが同時に内皮依存性弛緩機構に影響を及ぼすなど複雑な機構を持って血管収縮を調節している。今回我々はロンボキサン A₂ 受容体を介する血管収縮機構を、α 受容体を介する血管反応と比較することでその特徴を明らかにしようと試みた。実験にはラットの腸間膜動脈を標本として用い、ワイヤミオグラフを用いて等尺性にその張力を測定した。またガラス微小電極法を用いて、張力測定と同時に血管細胞の膜電位を測定した。トロンボキサン A₂ 受容体アゴニストとして U46619, α 受容体アゴニストとしてフェニレフリンを用い、それぞれによる収縮 (張力) と膜電位変化の関係を調べた。フェニレフリンと U46619 はそれぞれ濃度依存的に脱分極と収縮を引き起こした。しかし、3 μM 以上の濃度のフェニレフリンを投与すると、膜電位変化と収縮はオシレーションし、両者は同期していた。U46619 は 10 nM から脱分極と収縮を始めたが、フェニレフリンの閾値は 1 μM であった。脱分極の大きさと張力変化の大きさの関係をみると、同じ脱分極の大きさでもフェニレフリンのほうがより大きな張力変化をさせていた。しかし、NOS 阻害剤存在下では両者の脱分極-張力変化の関係は差が見られなくなった。NOS 阻害剤存在下では 0.3 μM の U46619 は脱分極とともにスパイク状の活動電位を伴うようになった。この活動電位はニフェジピンで消失した。また、イベリオトキシン存在下でも脱分極-張力変化の関係におけるフェニレフリンと U46619 の間の差は見られなくなった。以上の結果からフェニレフリンと U46619 はどちらも膜電位依存的に収縮する機構を有するが、U46619 はより低い濃度で収縮を引き起こし、同時に NO を産生させるという、異なる血管張力制御機構を有していると考えられた。

P-03 血管平滑筋の異常収縮時に見られる細胞膜表面の変化

山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学

○加治屋 勝子, 岸 博子, 高田 雄一, 張 影, 木村 友彦, 宮成 健司, 小林 誠

Rho キナーゼを介する血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性亢進は, 血管攣縮などの血管異常収縮の主因として注目されている. 我々は, その上流の因子として, スフィンゴ脂質の一種であるスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定した. また, $\text{SPC} \rightarrow \text{Fyn}$ チロシンキナーゼ \rightarrow Rho キナーゼという新規のシグナル経路によって異常収縮を引き起こすことを見出し, 実際に, *in vivo* で血管攣縮を誘発した. さらに, ヒト血管では, SPC による異常収縮の大きさは, 血清および組織のコレステロール量と正相関を示した. 一方, 脂質異常症で増加したコレステロールは, 細胞膜に均一に蓄積するのではなく, 膜ラフトという膜ドメインに局限して蓄積することが知られている. そこで, 本研究では, SPC によって引き起こされる血管平滑筋の異常収縮時に, 細胞膜全体がどのように動的に変化し, さらに膜ラフトがどのようににかかわっているのかを検討した.

膜ラフトのマーカーであるカベオリンを用いて, シグナル分子の細胞内局在を調べ, SPC により Fyn と Rho キナーゼは細胞質から膜ラフトへ移動していることを明らかにした. また, コレステロール除去剤によって膜ラフトを消失させると, SPC による Fyn と Rho キナーゼの移動および異常収縮が抑制されたが, 高 K 脱分極による Ca^{2+} 依存性収縮には無効であった. さらに, 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて, 異常収縮時の細胞膜の表面形状を観察するため, 人工モデル膜を用いて条件検討を行い, 脂質組成の異なる膜の表面形状や, 様々なスフィンゴ脂質が膜に作用した時の表面形状などを解析した. 同様に, 血管平滑筋細胞についても, SEM を用いて膜表面形状の観察を行った.

本研究により, SPC によって引き起こされる血管平滑筋の異常収縮は, シグナル伝達の反応の場として膜ラフトが重要な役割を果たしていると考えられ, 細胞膜全体の動的変化との関連を示唆する知見が得られた.

P-04 イミプラミンによる排尿障害に対するジスチグミンの改善効果

東邦大・薬・薬理

○小原 圭将, 相川 直己, 佐藤 恭輔, 茅野 大介, 田中 芳夫

【背景・目的】Distigmine (Dis) は, 手術後や糖尿病などの慢性疾患に付随して発症する尿排出機能障害 (低活動膀胱) に対して用いられる可逆的 ChE 阻害薬である. Dis は, imipramine (Imi) を代表とする抗うつ薬が持つ抗コリン作用に起因する尿排出機能障害の軽減目的にも用いられるが, その実験的根拠は十分とはいえない. 本研究では, *in vivo* ならびに *in vitro* の評価系を用いて, Imi による排尿運動障害に対する Dis の改善効果を検討し, 合成コリンエステルである bethanechol (Bet) の効果と比較した.

【方法】シストメトリー法により, 麻酔下モルモットの膀胱内圧変動を記録した (*in vivo* 評価系). また, モルモットから摘出した膀胱の排尿筋標本を作成し, acetylcholine (ACh) による収縮反応を記録した (*in vitro* 評価系).

【結果】① Dis (10^{-7} – 3×10^{-7} M) は, Imi (10^{-6} M) 存在下で抑制された ACh による収縮反応を, Imi 非存在下での反応と同程度もしくはそれ以上にまで回復させた. ② Dis (0.03 mg/kg) は, 前処置により, Imi (10 mg/kg) による排尿時最大膀胱内圧 (IVP_{max}) の低下を抑制し, 後処置によっても, Imi (30 mg/kg) によって低下した IVP_{max} を回復させた. ③ Bet (0.1 mg/kg) では, IVP_{max} の回復効果は明確ではなく, 投与直後の排尿間隔は短縮された. ④ Dis, Bet のいずれも, Imi により短縮された排尿間隔と抑制された排尿量を, 速く回復させる傾向が認められた.

【考察】Dis, Bet ともに, Imi による尿排出機能障害に対して改善効果を示すが, 排尿間隔と IVP_{max} に対する影響を考慮すると, Dis のほうがより高い治療効果をもたらす可能性が示唆された.

P-05 ウシ毛様体筋におけるムスカリン受容体作動性陽イオンチャネルの薬理学的特徴

旭川医大・生理学・自律機能分野

○宮津 基, 竹谷 浩介, 赤尾 鉄平, 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 受容体からチャネルに至る信号経路についてはよくわかっていない。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、SR Ca^{2+} ポンプ阻害薬である thapsigargin (TG) と SR Ca^{2+} の放出薬 caffeine、さらに、近年 Ca^{2+} 貯蔵枯渇によって活性化されるチャネルの阻害剤として用いられている 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) 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 のみの開口を維持した。caffeine 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、全膜電流測定においては NSCCS のみを開口させた。caffeine とライアノジン (10 μM) を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。100 μM 2-APB は CCh, caffeine によって誘起される NSCCS 電流を速やかに抑制したが、10 μM 以下の濃度ではその効果は観察されなかった。これらの結果から、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+} 貯蔵の枯渇を介して活性化されるイオンチャネルである可能性が示唆された。

P-06 マウスにおけるタバコ主流煙誘発気道過敏性に対する PI3K γ および δ 阻害薬の併用効果

¹日本大・薬・機能形態, ²NHLL, Imperial College London

○木村 元気¹, 上田敬太郎¹, 渡辺 裕治¹, 江藤 翔一¹, Kazuhiro Ito², 草間 貞¹, 木澤 靖夫¹

【目的】PI3K γ および δ シグナルは、炎症細胞の機能調節に関与することが知られている。我々はこれまでに、COPD 患者の肺組織における PI3K δ の upregulation, タバコ主流煙曝露マウスにおける気道炎症に対する PI3K δ 阻害薬のステロイド感受性改善効果および PI3K γ と δ 阻害薬の併用効果について報告している。本研究では、タバコ主流煙曝露マウスにおける気道過敏性 (AHR) に対する選択的 PI3K γ と δ 阻害薬の効果について検討した。

【方法】雄性 A/J マウスに 11 日間連続でタバコ主流煙を曝露させ、タバコ煙曝露終了翌日から 1 日 2 回 3 日間、AS604850 (AS), IC87114 (IC) および fluticasone propionate (FP) を経鼻投与した。AHR は最終薬物投与 24 時間後、ヒスタミン吸入前後の特異的気道抵抗の増分率 Δ [sRaw/TV] を指標として測定した。モルモット気管平滑筋における carbachol (CCh) 誘発収縮反応に対する PI3K 阻害薬の効果は、雄性 Hartley 系モルモットから気管を摘出し常法に従って作製した標本をオルガンバス内に懸垂し、筋の発生張力を等尺性に記録することにより測定した。

【結果および考察】タバコ煙曝露により誘発された A/J マウスにおける AHR は、AS および IC の単独適用により有意に抑制された。この抑制効果は、AS と IC の併用により増強された。さらに、AS と FP の併用では観察されなかったが、IC と FP を併用するとタバコ煙誘発 AHR は IC 単独適用に比べ有意に抑制された。一方、モルモット気管平滑筋における CCh の濃度収縮曲線は、AS 処理により右方へシフトし最大反応も有意に抑制されたが、IC 処理による影響は限定的であった。以上の結果より、PI3K δ あるいは PI3K γ/δ 阻害薬とステロイドの併用は、COPD に対し優れた治療効果を発揮することが期待される。

P-07 PDE4 および PDE5 は、ウシ第四胃において環状ヌクレオチドによる弛緩効果を制御する

日本獣医生命科学大学獣医学部 ¹獣医学科・獣医薬理学教室, ²獣医保健看護学科

○金田 剛治¹, 木戸 優希^{1,2}, 田島 剛¹, 浦川 紀元¹, 清水 一政¹

乳牛において第四胃アトニーから続発する第四胃変位は分娩後初期に多発する消化器病の1つであるが、その発生要因については実験的に立証されていない。一方、他の動物の単胃にあたるウシ第四胃においても他の平滑筋と同様に環状ヌクレオチドが運動機能の制御に関与することは知られているが、その環状ヌクレオチドの制御を担うホスホジエステラーゼ (PDE) のアイソフォームについては未だに明らかになっていない。そこで本研究は、ウシ第四胃平滑筋のカルバコール (CCh) 収縮に対する各種選択的 PDE 阻害剤の抑制効果と環状ヌクレオチドの関連性について調べた。1) CCh (1 μ M) による収縮に対して各種 PDE 阻害剤は、いずれも濃度依存的に抑制したが、その抑制効果は Ro20-1724 (4 型) > IBMX (非選択的) > vardenafil (5 型) > milrinone (3 型) > EHNA (2 型) > vinpocetine (1 型) > BAY736691 (9 型) > BRL-50481 (7 型) の順に大きかった。2) 第四胃平滑筋において、RT-PCR 分析により PDE4A, 4B, 4D 型および PDE5 型の mRNA 発現が確認された。3) CCh 存在下で Ro20-1724 は濃度依存性に cAMP 含量を増加したが、cGMP 含量には有意な変化を示さなかった。一方、CCh 存在下で vardenafil は cGMP 含量を濃度依存性に増加したが、cAMP 含量には有意な変化を示めさなかった。以上より、ウシ第四胃平滑筋において PDE4 型阻害剤である Ro20-1724 は cAMP 含量の増加を伴い、PDE5 型阻害剤である vardenafil は cGMP 含量の増加を伴い CCh 収縮を抑制した。また、ウシ第四胃平滑筋において PDE4B, C, D および PDE5 の mRNA 発現が見られたことから、ウシ第四胃平滑筋の運動機能の制御に PDE4 および PDE5 が関連することが示唆された。

P-08 高速 MRI による流動食摂取後の胃排出・十二指腸運動の評価

¹紘仁病院内科, ²名古屋大学大学院医学研究科細胞生理学講座, ³アールテック

寺本 英巳¹, ○谷口 瑞毅², 清水 利恭³, 小杉 隆司³, 中山 晋介²

胃排出は胃と十二指腸の協調運動によって実現される。したがって、胃排出とそれに関与するメカニズムの評価は、医学研究のみでなく臨床治療にも有用である。健康的な被験者に対して、流動食の摂取後に冠状面に沿って腹部の磁気共鳴画像 (MRI) の高速撮影を行った。3T MRI 装置 (Signa EXCITE HD3.0T, GE) において、FIESTA (Fast Imaging Employing STeady state Acquisition) シークエンスを用い、約 1.7 秒間隔で画像を取得した。胃底部・十二指腸の面積は、独自に開発したセグメントソフトウェアによって半自動的に定量化した。連続 40 枚の MRI 画像から推定した漿膜側胃底部面積の平均は、流動食の摂取後 30 分では 81% に、60 分では 70% に減少した。十二指腸の平均面積も 30 分後には 86% に、60 分後には 83% に減少した。その一方で、重心の移動量は、30 分後には 5 倍、60 分後には 3 倍に増加した。また十二指腸壁の法線方向及び接線方向の平均移動速度は、重心の移動量と似た変化を示した。ドーパミン D2 受容体遮断薬であるメトクロプラミドの投与は、流動食摂取直後でも十二指腸の活動を促進し、これに伴う胃排出の促進が観察された。また、水分のみの摂取は、初期 30 分間の十二指腸の運動性を亢進するが、60 分後にはほぼ全量の胃内容物の排出を反映し十二指腸運動は静まった。高速 MRI スキャンは、カロリーとドーパミン作動性神経伝達によって変化する胃排出と十二指腸運動との関連性を可視化した。十二指腸部の重心と壁面の移動速度の変化は、シネ MRI (動画 MR 撮像法) によって得られる運動性を適切に表現すると思われた。

P-09 13C-acetate 水素呼吸試験による過敏性腸症候群の検討

東邦大学総合診療・救急医学講座

○瓜田 純久, 後藤 麻佑, 小磯 泰裕, 河越 尚幸, 竹本 育聖, 田中 英樹, 貴島 祥, 城戸 秀倫, 前田 正, 渡辺 利泰, 宮崎 泰斗, 菅澤 康幸, 竹内 基, 本田 善子, 松崎 淳人, 中西 員茂, 中嶋 均, 島田 長人, 杉本 元信

【はじめに】過敏性腸症候群（IBS）の病態には、消化管運動障害、腸内細菌の異常増殖、消化吸収障害、心因性など、複数の病態が関与していることが多い。今回、複数の医療機関で治療を受けるものの、十分な治療効果が得られず当院を受診した症例に対して、13C-acetate 水素呼吸試験を行い、IBS の病態について検討した。

【対象と方法】複数の医療機関で治療されたが改善せず、2011 年 12 月から 2012 年 3 月までに当科へ紹介された IBS43 例を対象とした。平均年齢 51.4 歳（12-82 歳, 男/女は 20/23）、平均受診医療機関は 3（1-6）であった。早朝空腹時に呼吸を採取し、13C-acetate100mg とラクツロース 15 cc をラコール 200 cc（200 kcal）に混入して飲用し、10 分間隔で 180 分まで呼吸を採取した。呼吸中 13CO₂ を UBit-300IR、水素・メタンガス濃度を TGA-2000 で測定し、その変化を経時的に観察した。

【成績】呼吸中 13CO₂ がピークとなる時間 Tmax 90 分以上の胃排出遅延は 5 例（11.6%）であり、30 分以下の胃排出亢進例は 3 例（7%）であった。呼吸中水素ガスが複数回のピークを取る場合、前値より 10ppm 以上の上昇が複数回ある場合を小腸 bacterial overgrowth（SIBO）とすると、SIBO は 20 例（47%）にみられた。口盲腸通過時間（OCTT）が評価できたのは 25 例（58%）であり、OCTT 150 分以上であったのは 6 例（14%）であった。

【まとめ】IBS において消化管運動が関与していたのは 30%、腸内細菌の関与が示唆されたのは 47%、両者が併存したのは 5 例（12%）であった。難治性 IBS において、腸内細菌異常増殖と消化管運動異常が併存する症例は意外に少なく、病態は非常に多彩であった。

P-10 結腸内寒冷受容体刺激による結腸運動亢進・排便誘発作用の検討

東北大学大学院医学系研究科外科病態学講座生体調節外科学分野

○染谷 崇徳, 柴田 近, 長尾 宗紀, 田中 直樹, 佐々木 宏之, 松田 泰史, 宮地 智洋, 菊地 大介, 井本 博文, 海野 倫明

【背景】Transient receptor potential cation channel（TRP）受容体中の subfamily V member 1（TRPV1）の agonist である capsaicin をイヌの胃内や結腸内に投与すると、結腸運動が亢進することを我々は明らかにした。TRPV1 は温熱受容体であるが、TRP 受容体 subfamily には寒冷受容体である TRPA1 が存在する。TRPA1 が TRPV1 と同様に結腸運動に関与するのではないかと考えた。【目的】結腸内へ TRPA1 agonist を投与し、結腸運動亢進・排便誘発効果とその作用機序を解明する。【方法】ビーグル犬を用い、strain gauge force transducer を結腸 3 か所に縫着・固定し、意識下で結腸運動を測定した。また、盲腸経由で先端が近位結腸内腔に位置するようにシリコンチューブを挿入した。TRPA1 agonist の allyl isothiocyanate（以下：AITC）5 mg, 10 mg をシリコンチューブから結腸内腔に投与し、消化管運動と排便に対する効果を検討した。また、拮抗薬（atropine 1 mg/kg i.v., hexamethonium 5 mg/kg i.v., 以下同様）前投与の AITC 誘発性結腸収縮に対する効果も検討した。投与後 30 分間の波形下面積を計算し、motility index として運動の定量化に用いた。【結果】AITC 5 mg, 10 mg の投与直後から結腸に巨大伝播波収縮（giant migrating contractions: GMCs）を高頻度に誘発し、排便を誘発した。このことから、Capsaicin による TRPV1 受容体刺激と同様に TRPA1 受容体刺激が結腸運動を亢進し、排便を誘発すると想定された。【結語】AITC 結腸内投与は結腸運動を亢進させ、排便を誘発するすると考えられた。