

O1-1 GERD 症例と非 GERD 症例における「喉のつまり感」に関連する食道運動機能の差異

¹川崎医科大学検査診断学（内視鏡・超音波），²川崎医科大学消化管内科学，³川崎医科大学総合臨床医学

○眞部 紀明¹，筒井 英明²，今村 祐志¹，楠 裕明³，畠 二郎¹，春間 賢²

【背景】High resolution manometry (HRM) の開発により，食道横紋筋領域と平滑筋領域の境界に相当する transition zone (TZ) の測定が可能となった。近年，同領域の協調運動が不良であると，しばしば嚥下物の停滞を引き起こす事が推察されている。「喉のつまり感」は日常診療でよく遭遇する疾患であり，その原因の一つに胃食道逆流症 (GERD) が関係している事が報告されている。しかしながら，そのメカニズムについては不明な点が多い。【目的】GERD 症例と非 GERD 症例の「喉のつまり感」に関する食道運動機能の差を検討した。【対象および方法】2007 年 9 月～2011 年 3 月の間に当施設で HRM を施行した 234 例のうち，「GERD 症状」あるいは「喉のつまり感」を主訴とし，器質的疾患を認めない 124 例を対象とした。測定方法については 6 時間以上の絶食の後，鼻腔よりカテーテルを挿入後，生食 5 cc，ゼリー 5 cc をそれぞれ 10 回ごと嚥下させ，食道運動機能と bolus transit を同時に評価した。使用機種は Sandhill Scientific 社製 INSIGHT G3 で，38 チャンネル EFT カテーテルを用いた。「喉のつまり感」の程度に関する問診調査は，7-point Likert scale を用い，HRM 検査前に患者自身から回答を得た。【結果】対象は「喉のつまり感」と「GERD 症状」の両症状を訴える 66 例 (A 群：男性 26 例，平均年齢 54.2 歳)，「GERD 症状」のみの症例 22 例 (B 群：男性 18 例，平均年齢 51.3 歳)，「喉のつまり感」のみの症例 28 例 (C 群：男性 14 例，平均年齢 54.9 歳) に分類できた。C 群と A 群間における「喉のつまり感」の程度には差を認めなかったが，C 群は A 群，B 群と比較して，有意に TZ の時間が延長し ($p<0.01$)，TZ の距離が長く ($P<0.01$)，横紋筋領域と平滑筋領域の協調運動不良が認められた。一方，A 群は B 群と比較して，食道体部の蠕動波の出現率が有意に低下していた ($p<0.05$)。【結論】GERD 症例における「喉のつまり感」は食道体部の蠕動波の出現率低下に起因しており，非 GERD 症例の「喉のつまり感」は TZ の協調運動不良に起因していた。

O1-2 24 時間多チャンネルインピーダンス・pH モニタリング (MII-pH) からみた酸逆流・非酸逆流に対する腹腔鏡下噴門形成術 (LARS) の逆流防止効果

東京慈恵会医科大学外科学消化管外科，¹同外科学講座

○矢野 文章，小村 伸朗，坪井 一人，星野 真人，山本 世怜，秋元 俊亮，石橋 由朗，三森 教雄，柏木 秀幸¹，矢永 勝彦¹

【背景と目的】MII-pH は，食道内抵抗のモニタリングにより，液体や気体の嚥下もしくは逆流を感知するとともに，食道内 pH を同時測定することで，酸か酸以外の逆流かの判別を行える検査法である。今回，MII-pH を用いて GERD 症例に対する腹腔鏡下逆流防止手術 (LARS) の治療効果を検討した。

【対象と方法】2012 年 3 月までに erosive GERD の診断にて LARS を施行し，かつ手術前後に MII-pH を施行した患者 10 人を対象とした。これらの検査結果を術前後で比較し，LARS の逆流防止効果について検討した。統計学的解析は Wilcoxon signed-rank test を用いて施行し， $p<0.05$ をもって有意差ありと判定した。

【結果】術前 10 人の平均 pH<4HT (%)，酸液体/気体逆流回数 (回/日)，非酸液体/気体逆流回数 (回/日) はそれぞれ，9.2 (2.6-32.3) %，44.6 (23-110)/6.4 (0-20) 回/日，23.8 (3-54)/15.6 (3-47) 回/日であり，術後は 0.2 (0-1.0) %，9.5 (0-39)/0.5 (0-2) 回/日，41.0 (6-116)/9.6 (2-44) 回/日であった。pH<4HT と酸液体逆流回数は術前と比較して術後に有意に減少した (いずれも $p=0.005$)。非酸液体逆流回数は術後増加していたが，統計学的有意差は認められなかった ($p=0.059$)。術前 8 人 (80%) が Symptom index (SI) 陽性であり，うち 7 人は (88%) は液体酸逆流によるものであった。術後も 4 人 (40%) が SI 陽性であったが，いずれも非酸液体逆流による症状であった。術前 SI 陽性であった 8 人のうち術後も陽性だった患者は 2 人で，術前陰性にもかかわらず術後陽性となった患者が 1 人いた。

【結語】LARS は酸逆流をほぼ完全に抑制し，かつ液体酸逆流による SI はすべて陰性化した。

01-3 一過性 LES 弛緩終了後に出現する蠕動波, LES は強収縮を有する

¹日本医科大学付属千葉北総病院消化器内科, ²日本医科大学消化器内科学

○岩切 勝彦^{1,2}, 川見 典之², 佐野 弘仁², 田中 由理子², 梅澤 まり子², 坂本 長逸²

【目的】一過性 LES 弛緩は健常者, GERD 患者の胃酸逆流の主なメカニズムである。われわれは, 食道内圧検査により一過性 LES 弛緩の評価を行ってきた。一過性 LES 弛緩終了直後に出現する蠕動波および LES 圧は通常の蠕動波, LES 圧に比べ強収縮を起こすことが多いことを認識していたが, これらの強収縮を的確に評価する方法がないのが現状であった。近年開発された high resolution manometry (HRM) では多数の圧を解析するのは困難であるため, 指定した部位の基準値以上の圧を有する領域の volume (mmHg・cm・sec) を算出する機能 (contractile integral: CI) がある。今回, 一過性 LES 弛緩前後の蠕動波の distal CI (DCI) および esophagogastric junction (EGJ) の CI を測定し, 一過性 LES 弛緩終了後に出現する蠕動波, EGJ 収縮の特徴を明らかにする。

【方法】健常者 10 名に対して食後 1 時間の食道内圧・pH 同時測定を座位の姿勢にて行った。食道内圧検査は 21channel の HRM にて施行した。胃近位部から下部食道に関しては 1 cm 間隔 10 個の圧センサーにより測定した。下部食道から上部食道は 2-3 cm 間隔の圧センサーにて測定し, 上部食道から咽頭は 3-4 cm 間隔にて測定した。一過性 LES 弛緩は既報の HRM による一過性 LES 弛緩の定義に従い解析した。一過性 LES 弛緩終了前後に出現する蠕動波の DCI (0 mmHg 以上) と蠕動波に引き続きみられる EGJ の 8 秒間の CI (0 mmHg 以上) を比較検討した。

【成績】測定中に計 56 回の一過性 LES 弛緩が出現した。56 回中 43 回 (76.8%) の一過性 LES 弛緩後の蠕動波の DCI は一過性 LES 弛緩前の DCI に比べ増加, 35 回 (62.5%) は 50% 以上の増加がみられた。一過性 LES 弛緩後の DCI (1354 [697-2354], median [interquartile range]) は前 (480 [198-896]) に比べ有意 ($p < 0.0001$) な増加がみられた。EGJ の CI は, 56 回中 54 回 (96.4%) が増加し, 48 回 (85.7%) は 50% 以上の増加がみられた。一過性 LES 弛緩後の EGJ の CI (677 [440-1067]) は前 (206 [131-313]) に比べ有意 ($p < 0.0001$) な増加がみられた。

【結論】一過性 LES 弛緩後の蠕動波の DCI, EGJ の CI は通常時のものより有意に強い収縮であった。蠕動波の DCI, 蠕動波出現後の EGJ の CI を注目することにより一過性 LES 弛緩を容易に検出できると思われる。

02-1 スンクスを用いた消化管収縮運動制御機構の解析—モチリンとグレリンの協調作用—

¹埼玉大学大学院理工学研究科, ²埼玉大学総合研究機構脳科学融合研究センター

○坂井 貴文^{1,2}, 宮野 祐樹¹, Anupom Mondal¹, 星野 賢哉¹, 相澤 清香¹, 坂田 一郎¹

我々は, 消化管運動研究のためにモチリンとグレリンの両ホルモンを産生する小型実験動物を探索し, 食虫目に属するスンクス (*Suncus murinus*) からモチリンとグレリン及びそれらの受容体を同定した。このスンクスを用いて *in vivo* での消化管運動測定系を確立し, 両ホルモンの消化管運動に対する作用を検討した。消化管にフォーストランスデューサーを縫着し, 無麻酔・無拘束下で消化管運動を記録したところ, ヒトやイヌと同様の, phase I~III の 3 相から構成される空腹期伝播性消化管収縮運動 (MMC) が観察された。モチリンの投与は胃で phase III 様収縮を惹起し, この収縮はアトロピン前処理で完全に阻害された。一方, phase I 後半でのグレリン投与は phase II 様収縮を惹起し, phase II へのグレリン投与は phase II 収縮を増強した。また, phase II におけるグレリンアンタゴニスト ([D-Lys-3]-GHRP-6) の投与は, 投与中の phase II 収縮と Phase III 収縮の開始を抑制した。しかしながら, phase II でのモチリンアンタゴニスト (MA-2029) の投与は phase II 収縮に影響を与えなかったが, 投与中の phase III 収縮の開始を阻害した。さらに, ウレタン麻酔下でのグレリン単独投与は胃収縮運動を刺激しなかったが, 低濃度のモチリンとグレリンの共投与は phase III 様の強収縮を惹起した。

以上の結果から, グレリンとモチリンは協調的且つ相乗的に胃収縮運動を刺激することによって MMC を調節していることが示唆された。

02-2 Motilin and ghrelin regulate gastric contraction via the myenteric plexus in *Suncus murinus* (house musk shrew)

¹Area of Regulatory Biology, Division of Life Science, Graduate School of Science and Engineering, Saitama University, ²Saitama University Brain Science Institute, Saitama University

○ Anupom Mondal¹, Yoshiaki Shimada¹, Kanako Koike¹, Ichiro Sakata¹, Takafumi Sakai^{1,2}

Human and canine studies have shown that motilin, the gastrointestinal hormone released during a fasting state, induces gastric phase III contractions via the enteric nervous system. However, the pathway of motilin action in the stomach has not been elucidated. In this study, we examined the neural pathway of motilin-induced gastric contraction using *Suncus murinus*, a new animal model for motilin studies. We first studied the effect of motilin on the isolated suncus stomach using an organ bath system to determine the mechanism of motilin action via the myenteric plexus. Motilin-induced contractions were also examined using a pharmacological method with several receptor antagonists and inhibitors. Suncus motilin (10^{-9} to 10^{-7} M) was used to induce concentration-dependent gastric contractions. The responses to suncus motilin in the stomach were completely abolished by atropine and tetrodotoxin treatment and significantly suppressed by hexamethonium, phentolamine, yohimbine, verapamil, ondansetron, and naloxone administration, whereas ritanserin, prazosin, timolol, and FK888 did not affect the motilin action. Additionally, *N*-nitro L-arginine methylester slightly potentiated the contractions induced by motilin. We next studied ghrelin-induced gastric contraction in the presence of different concentrations of motilin. After pretreatment with a low dose of motilin (10^{-10} M), ghrelin dramatically stimulated gastric contraction from 10^{-10} M in a dose-dependent manner. In addition, after pretreatment with 10^{-8} M ghrelin, motilin started to evoke gastric contraction from low doses (10^{-10} M). These results suggest that motilin and ghrelin induce synergistic gastric contractions through a myenteric neural pathway in suncus *in vitro*.

02-3 嘔吐する小型実験動物スunksの食道縦走方向運動に対する制御機構

岐阜大学応用生物科学部獣医生理学研究室

○椎名 貴彦, 志水 泰武

スunks (*Suncus murinus*) は、物理的・化学的刺激に応答して嘔吐する能力を持つ小型実験動物である。嘔吐は、主として胃の逆蠕動運動によって起こる現象であるが、食道もまた嘔吐において一定の役割を果たしている。そのひとつとして、食道は、嘔吐時に縦走方向の短縮反応を起こし、胃内容物の口腔への運搬を助けると考えられている。しかしながら、嘔吐に関連すると予想されるスunks食道の縦走方向運動に対する調節機構は、ほとんど解明されていない。そこで本研究では、スunks食道の縦走方向運動がどのような因子によって制御されているかについて明らかにすることを目的とした。スunksから食道を分離して、加温通気した栄養液で満たしたオルガンバスにセットした。張力トランスデューサーにより、食道の縦走方向の機械的反応を記録した。食道周囲の迷走神経を電気刺激したところ、二相性の収縮反応が誘発された。迷走神経刺激による二相性の収縮反応を薬理的に調べたところ、一相目の反応は横紋筋のニコチン性アセチルコリン受容体の阻害薬である α -ブングアロトキシンによって消失した。一方、二相目の反応は平滑筋のムスカリン性アセチルコリン受容体の阻害薬であるアトロピンを投与することで消失した。これらの結果は、スunks食道の縦走方向運動は横紋筋および平滑筋によって生じること、いずれの反応もコリン作動性迷走運動神経による支配を受けていることを示唆している。次に、非コリン作動性因子の関与を検討するため、ヒスタミンおよびセロトニンをそれぞれオルガンバスに投与した。いずれの物質も、食道標本を収縮させた。薬理的な検討により、ヒスタミンおよびセロトニンによって誘発された収縮反応は平滑筋の反応であることが示された。以上の結果から、スunks食道縦走方向運動は、コリン作動性および非コリン作動性の機構によって制御されていることが明らかとなった。

02-4 シスプラチン投与後の消化管運動と嘔吐

群馬大学大学院病態総合外科学

○矢内 充洋, 森田 廣樹, 小川 敦, 緒方 杏一, 大野 哲郎, 持木 彫人, 桑野 博行

【目的】癌化学療法による悪心・嘔吐は高頻度に出現する副作用の1つであり、患者のQOLに大きな影響を及ぼす。特に悪心・嘔吐のハイリスク薬剤として代表的なCisplatinの投与に際しては、完全に制御するのは困難であり、そのコントロールは非常に重要な課題である。シスプラチンによる嘔吐についての報告は、フェレットやラットを用いたものが多く、また消化管運動との関係について検討した報告は少ない。本研究では、消化管運動がよりヒトに近いと思われるイヌにおいて、シスプラチン投与後の消化管運動を測定し、嘔吐のメカニズムを検討した。

【方法】ビーグル犬を用いて、全身麻酔下で消化管運動測定用のforce transducerを胃体部、前庭部、十二指腸、空腸2箇所に着着、回復期間の後に意識下で消化管運動を測定した。空腹期にシスプラチンを投与し、その後の消化管運動を測定した。各種の制吐剤やantagonistを投与し、シスプラチン投与後の嘔吐および消化管運動に対する作用を検討した。また、シスプラチン投与後の血中セロトニン濃度および血中グレリン濃度を測定した。

【結果】シスプラチンを投与すると、正常な空腹期収縮(IMC)は消失し、投与後約3時間から胃から空腸にかけて律動的な強い収縮運動が出現(約5時間持続)、同時に嘔吐をきたした。5-HT₃受容体拮抗薬(ondansetron)の前投与によりシスプラチンによる異常収縮は有意に抑制され、嘔吐回数も有意に減少、さらに正常なIMCの回復ははやくなる傾向が認められた。NK1受容体拮抗薬(aprepitant)の前投与でも、嘔吐回数は有意に減少した。血中セロトニン濃度は異常収縮および嘔吐と一致して有意に上昇したが、血中グレリン濃度には有意な変化を認めなかった。

【考察】シスプラチンを投与すると上部消化管に異常な収縮運動が出現し嘔吐をきたした。この反応はシスプラチン投与により放出されたセロトニンにより、5-HT₃受容体を介して生じると考えられた。NK1受容体拮抗薬は遅発性の嘔吐だけでなく、急性期の嘔吐に対しても有効であると考えられた。シスプラチン投与後の異常収縮が嘔気・嘔吐、腹痛、下痢などの消化管障害の原因のひとつとなっている可能性が示唆された。

03-1 幽門側胃切除術における迷走神経と幽門輪温存の評価

¹日本歯科大学生命歯学部外科学講座, ²藤崎病院外科, ³日本大学医学部外科系小児・乳腺内分泌外科分野,

⁴福島県立医科大学医学部腫瘍生体治療学講座

○富田 涼一^{1,3}, 藤崎 滋², 朴 英智¹, 杉藤 公信³, 池田 太郎³, 越永 従道³, 柴田 昌彦⁴

【目的】機能温存(迷走神経と幽門輪温存)幽門側胃切除術の有用性を病態生理学的に検討した。【方法】術後3年以上の早期胃癌幽門側胃切除術50例を迷走神経・幽門輪温存術20例(A群; 男性15例, 女性5例, 39~70歳, 平均63.8歳), 迷走神経と幽門輪の非温存30例(B群; 男性18例, 女性12例, 40~75歳, 平均66.8歳)に分けた。対照は20例(C群; 男性14, 女性6例, 28~65歳, 平均55.8歳)である。これらを臨床的症狀, 生理機能検査所見を比較検討した。【成績】1) 直接問診法: 食欲が術前と同様の症例はA群がB群より有意に多かった($p<0.01$)。早期ダンピング症候群はA群がB群より少なかった。逆流性食道炎はA群がB群より有意に少なかった($p<0.05$)。食後腹満感はA群がB群より有意に多かった($p<0.01$)。2) 食道残胃の内視鏡検査; 逆流性食道炎はA群がB群より, 残胃炎はA群がB群より有意に少なかった(それぞれ, $p<0.01$)。3) 残胃排出機能検査; 半固形食ではA, B群ではC群より有意に延長していた($p<0.01$)。液体食ではB群ではA, C群より有意に排出促進した($p<0.01$)。4) 下部食道括約筋(LES)圧; B群ではA, C群より有意に低かった($p<0.05$)。【結論】迷走神経と幽門輪の温存は胃切除後障害が少なく生理的な術式であるが, 固形食排出機能低下で食後腹満感を訴える症例を認めた。

03-2 幽門保存胃切除術の評価 呼気テストおよびアンケート調査を用いて—幽門側胃切除との比較から

東京女子医科大学第二外科

○金島 研大, 瀬下 明良, 三宅 邦智, 速水 克, 春日 満貴子, 亀岡 信悟

【目的】近年、検診の普及から比較的早期の胃癌が増加している。それらの早期胃癌に対して縮小手術、温存手術が行われるようになり、M領域の早期胃癌に対しては幽門保存胃切除術（PPG）が選択されることが増えてきた。今回 PPG の有用性を 13C 呼気テストおよびアンケート調査を用いて幽門側胃切除との比較から検討した。

【対象と方法】当科で 2000 年 4 月から 2012 年 1 月の間に施行した胃癌手術のうち、術後に呼気試験を行った幽門側胃切除術（DG）37 例、幽門保存胃切除術（PPG）16 例を対象とした。

平均年齢は 64.8 歳（38-89、中央値 65）で男女比は 28:25。

尚、PPG は、幽門下動脈を温存し、右胃動脈は根部または胃への第 1 枝分枝後に切除する。自律神経は可及的に温存し、吻合は層層に行っている。

検討項目として、13C 法を標準法変法である 2 時間法にて行い、アンケート調査は包括的 QOL 評価指標として SF-36 質問票を、疾患特異的 QOL 評価指標として GSRS 質問票を用い、それぞれ比較検討した。

【結果】PPG は DG と比較して、客観的な評価では呼気テストで差を認めた（PPG: Tmax 38.9±18.00 min GR: Tmax 17.0±7.52 min）。包括的評価では差はなく、主観的評価の疾患特異的指標ではより良好な QOL を呈した。

03-3 食道癌術前化学療法による消化管粘膜障害とそれに伴う栄養吸収障害の 13C 呼気試験法による評価

¹がん・感染症センター東京都立駒込病院食道外科, ²帝京大学附属病院内科, ³城西国際大学薬学部

○了徳寺大郎¹, 三浦 昭順, 出江 洋介, 加藤 剛, 坂本 啓, 山本 貴嗣², 久山 泰, 佐仲 雅樹³

食道癌の 5FU を用いた術前化学療法は標準治療のひとつである。その有害事象である粘膜障害、それに伴う吸収障害は術後の QOL に影響する。そのため、術前に化学療法の消化管に対する影響を評価することは術後の QOL 向上のためにも重要である。今回、食道癌患者において、術前化学療法前後の消化管の粘膜・吸収障害の影響を 13C 酢酸 Na 塩を用いた呼気試験で検討した。対象は当科で胸部食道癌と診断、1. 未治療、2. 経口摂取可能かつ術前化学療法を施行し検査の協力を得られた 7 名。化学療法施行前と終了後、下痢などの有害事象が完全に改善した時期の計 2 回、13C- 酢酸 Na 塩（100 mg）を添加したゲル状検査食（ペプチーノ[®]（テルモ）200 ml+イーザーゲル[®]（大塚製薬）3 パック）を使用し、摂取前、摂取後における呼気中 13CO₂ 変化量（Δ‰）を定量的に評価した。13C 法胃排出能検査・標準法に準じて行った。有害事象に関しては CTCAEv4.0 に準拠した。Grade 1 以上の下痢を 7 例中 3 例（43%）に認めた。下痢を認めた 3 例全例、化学療法前と比較し化学療法後において平均 Tmax が化学療法前後でそれぞれ 105, 80.0（ $p=0.444$ ）、Cmax がそれぞれ 30.3, 21.0（ $p=0.028$ ）となり化学療法後において有意に Cmax が低値となった。一方、下痢を認めなかった症例では平均 Tmax が化学療法前後でそれぞれ 90.0, 87.5（ $p=0.833$ ）、Cmax がそれぞれ 28.1, 30.8（ $p=0.391$ ）となり、化学療法前後ではほぼ変化は認めなかった。化学療法により下痢を発症した症例は、下痢が改善した後も消化管吸収障害が依然として残存していることが示唆された。13C 呼気試験を用いて、食道癌患者に対する化学療法施行に伴う粘膜・吸収障害を簡便かつ客観的に評価できうる可能性が示された。

04-1 ラット遠位結腸粘膜下細静脈の形態および機能解析

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学分野

○三井 烈, 宮本 駿, 高野 博充, 橋谷 光

【背景】消化管壁内の微小循環における血流制御については, 細動脈の制御機構を中心に研究が進められてきており, 細静脈の制御に関する知見は少ない. そこで本研究では, 遠位結腸粘膜下層細静脈の構造及び機能について検討した.

【方法】ラット遠位結腸粘膜下層の全載伸展標本を用いた免疫組織化学染色により, 細静脈平滑筋および神経支配に関する検討を行った. また, 細静脈の収縮機能に関して検討するため, 粘膜下層標本に 36°C のリンゲル液を灌流し, ビデオカメラおよび Diamtrak を用いて細静脈の直径の変化を記録した.

【結果】遠位結腸粘膜下層の細静脈では並走する細動脈と同様にアルファ平滑筋アクチン (α -SMA) 免疫陽性で輪状に走行する平滑筋が認められた. 細動脈は NG2 chondroitin sulphate proteoglycan 免疫陽性であったのに対し, 細静脈は陰性であったため, 両者の区別をする際に有用なマーカーであると考えられた. 多数の軸索膨大部を持つカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 陽性神経線維は, 主に細動脈に沿って観察されたが, 細静脈に沿って走るものも認められた.

粘膜下層の細静脈では, 1 分間に平均 5.6 回の自発収縮が認められた. 経壁神経刺激や, ノルアドレナリン (10^{-6} M) の投与により持続性の収縮が認められたが, これらの反応は α ブロッカー phentramine (10^{-6} M) の前投与により抑制された. CGRP (10^{-8} M) により, NO 非依存性の弛緩が認められた.

【結論】ラット遠位結腸粘膜下層の細静脈は輪状の平滑筋を有し, 自発収縮をすることが明らかとなった. また, 神経性制御を受けていることも示唆された. これらの機構により, 糞塊で遠位結腸の壁が圧迫された際にも細静脈の血流を途絶えさせることなく保持しているものと推察された.

04-2 STZ 誘発糖尿病ラット上腸間膜動脈における P2Y₁-receptor を介した血管弛緩反応性減弱メカニズム

星薬科大学・医薬品化学研究所・機能形態学研究室

○清野 唯, 石田 恵子, 松本 貴之, 小林 恒雄

【目的】細胞外 nucleotides は, purinoceptor に作用し, 血管緊張性調節に重要な役割を果たしているが, 糖尿病病態時における細胞外 nucleotides の反応性の変化, 特に 1 型糖尿病を長期的に罹患した状態での細胞外 nucleotides の血管反応性の変化やそのシグナル伝達については全く明らかとなっていない. そこで本研究は, 58-65 週齢の STZ 誘発糖尿病モデルラット上腸間膜動脈を用い, 特に P2Y₁-receptor を介する弛緩反応性の変化, 並びにそのシグナル伝達について検討した.

【方法】実験には 8 週齢の雄性 Wistar ラットに STZ 65 mg/kg を尾静脈注射し, 投与後 50-57 週経過した動物 (58-65 週齢) を diabetic 群, 同週齢の Wistar ラットを control 群として用いた. これら動物より上腸間膜動脈を摘出し, ADP, 2-MeSADP (selective P2Y₁-receptor agonist), ATP 誘発累積弛緩反応を検討した. また上腸間膜動脈における ADP 刺激時の NOx 産生量ならびに P2Y₁-receptor, eNOS, phosphorylated eNOS (Ser¹¹⁷) 発現を検討した.

【結果・考察】ATP 誘発弛緩反応は両群間で変化は認められなかった. しかしながら, control 群と比較して diabetic 群において, 1) ADP 誘発弛緩反応の減弱 (この反応は内皮除去標本, NOS inhibitor, selective P2Y₁-receptor antagonist 処置により両群共に抑制された), 2) 2-MeS ADP 誘発弛緩反応の減弱, 3) ADP 刺激時の NOx 産生量の減少, 4) ADP 刺激時の phospho-eNOS (Ser¹¹⁷) レベルの低下が認められた. P2Y₁-receptor 発現は両群間に変化は認められなかった. この結果から長期的な 1 型糖尿病の罹患は, P2Y₁-receptor を介した血管弛緩反応性を減弱させ, これは P2Y₁-receptor 発現には依存しない NO シグナルの減弱によることが明らかとなった.

04-3 ブタ冠動脈平滑筋細胞における IP_3 シグナルの電位依存性と Ca^{2+} 依存性

¹名古屋市立大学・大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学, ²愛知学院大学・薬学部・薬効解析学

○山村 寿男¹, 大矢 進¹, 村木 克彦^{1,2}, 今泉 祐治¹

平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動態の調節において重要な役割を果たす IP_3 産生の電位依存性と Ca^{2+} 依存性について検討した。ブタ冠動脈より平滑筋細胞を単離し、ホールセルパッチクランプ法によって電流・膜電位を記録した。同時に、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である indo-1 をパッチ電極より負荷し、共焦点蛍光顕微鏡 (Nikon RCM-8000) を用いて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を画像解析した。まず、ランプ波 (-90 mV から 0 mV) を用いて、膜電位 $-[\text{Ca}^{2+}]_i$ 関係を定量的に解析した。電流固定下、 K^+ チャネル開口薬 (levromakalim と Evans blue) によって誘発された過分極と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 減少の関係は、先の膜電位 $-[\text{Ca}^{2+}]_i$ 関係と良く相関した。過分極刺激 (-40 mV から -80 mV) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 減少は、細胞内全体で均一に起こり、この減少に IP_3 シグナルの阻害薬 (heparin, 2-APB, xestospongine C, U73122) は影響しなかった。一方、脱分極刺激 (-80 mV から 0 mV) による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加は、細胞膜近傍で先行して起こった。脱分極刺激によって、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時の 100 nM から 400 nM まで増加し、脱分極刺激の間 (60 s)、そのレベルを維持した。脱分極性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のピーク相に IP_3 シグナル阻害薬は影響しなかったが、プラトー相は 30 s 以内に 250 nM まで減少した。 Cd^{2+} 存在下による脱分極性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は、heparin 存在下のそれよりも有意に低かった。以上の結果、冠動脈平滑筋細胞において、脱分極誘発性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加のプラトー相に IP_3 産生による Ca^{2+} 遊離が寄与していることが示された。脱分極による電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が、ホスホリパーゼ C を活性化して IP_3 産生を増加させると考えられる。

04-4 DrVSP, 収縮作動薬による PIP_2 枯渇に対する TRPC3/C6/C7 チャネルの抑制的作用

¹福岡大学医学部生理学, ²大阪大学大学院医学研究科統合生理学, ³九州大学歯学部大学院全身管理歯科

○今井 裕子^{1,3}, 斎郷 平^{1,3}, 岡村 康史², 森 誠之¹, 井上 隆司¹

(目的) TRPC3/C6 は、ホスホリパーゼ C (PLC) 共役型受容体の刺激によって活性化される Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネルであり、心血管系や消化管系の平滑筋細胞に発現している。これらのチャネル活性化・不活性化過程には、受容体刺激によるホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP_2) 代謝回転亢進、とりわけ PLC を介した PIP_2 からのジアシルグリセロール (DAG) の産生増加が必須であると考えられているが、 PIP_2 自体の効果も報告されている。本研究では、電位依存性脱リン酸化酵素 (VSP)、 PIP_2 量の制御として用い、TRPC3/C6/C7 チャネルの活性化・不活性化が、膜 PIP_2 量の変化によってどのような制御を受けているか検討した。ゼブラフィッシュの VSP ホモログ DrVSP を TRPC3/C6/C7 チャネルそれぞれと共発現した HEK 細胞にカルバコール (CCh) を投与し、内因性ムスカリン受容体を刺激して内向き陽イオン電流を惹起した。この時、短い脱分極パルスを与えて DrVSP を活性化すると、一過性の強い電流抑制 (以下 VMI と略す) が観察された。VMI は、内因的な DAG 量を増加させる RHC80267 や DAG の膜透過型アナログ OAG の投与によって TRPC3/6/7 チャネルをより直接的に活性化した場合にも観察された。また、DrVSP の酵素活性を失活させる点変異の導入によって消失し、 PIP_3 に対する基質特異性を失わせる変異によって影響を受けなかった。このことから、VMI は、DAG の産生量の変化とは無関係に PIP_2 枯渇自体によって引き起こされることが強く示唆された。(2) VMI の程度は、脱分極の強度や持続時間を増すことによってある程度まで増強した。脱分極電位・持続時間と抑制の程度の定量的な関係から 50% の電流抑制に必要な電位 (V_{half}) 及び時間 (K_{half}) を求めると、 $\text{TRPC3} < \text{TRPC6} < \text{TRPC7}$ の順で DrVSP による PIP_2 枯渇による電流抑制が起こりやすいことが明らかとなった。(3) DrVSP、TRPC3/C6/C7 に加えムスカリン受容体を更に過剰発現した HEK 細胞では、内因性ムスカリン受容体の刺激時に比べ、速やかな活性化・不活性化を示す内向き電流が活性化された。またこの時、VMI は著しく減弱した。また、同様に減弱した VMI は A7r5 大動脈由来平滑筋細胞の多くの細胞においても観察された。(4) PLC-PH 領域を含む FRET PIP_2 センサーを用いて、膜 PIP_2 量と受容体刺激による電流振幅及び VMI の同時測定を行った。M1 受容体の過剰発現細胞を CCh 刺激すると、コントロール細胞に比べ、著しい PIP_2 量の減衰が観察された。また、VMI の大きさと PIP_2 枯渇の程度には明確な相関が見られ、DrVSP を介した抑制効果は内因性 PIP_2 量に依存していることが明示された。これらの結果から、TRPC3/C6/C7 チャネルは PLC 共役型受容体活性化に伴う DAG 産生によって活性化されると同時に、 PIP_2 量の減少自体によって負の制御を受けていることを明らかにした。また TRPC3 は TRPC7 に比べ 10 倍ほど PIP_2 に対する高い親和性を持つことが予測された。

04-5 腎動脈結紮高血圧モデルマウスにおける内向き整流性 K^+ チャネル (Kir2.1) の機能変化

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野, ²カルガリー大学医学部生理・薬理学分野

○鈴木 良明¹, 丸山 史登¹, 服部 美波¹, 山村 寿男¹, 大矢 進¹, William C. Cole²,
今泉 祐治¹

高血圧症は本邦における代表的な生活習慣病の1つであり, 腎血管性高血圧症 (RVHT) は全高血圧症のうち約1%を占めている。腎動脈が狭窄・閉塞して腎還流圧が低下することでレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が亢進し, RVHTを発症すると考えられている。Kir2.1チャネルはその機能発現が高い心筋細胞等において深い静止膜電位を形成することが知られており, 血管平滑筋細胞においても静止膜電位の形成に一部寄与すると報告されている。本研究では, 腎動脈結紮高血圧モデルとして2-kidney, 1-clip (2K1C) モデルマウスを作製し, 高血圧発症時の腸間膜動脈平滑筋細胞におけるKir2.1チャネルの発現・機能変化を解明することを目的とした。2K1C群では, 収縮期血圧が術後2週目から偽手術群 (sham) 群と比べて有意に上昇した。Kir2.1チャネル阻害薬である100 μ M Ba^{2+} による摘出小動脈 (径約150 μ m) の血管径減少反応は2K1C群で有意に低下した。単離平滑筋細胞に対して膜電位感受性色素 (DiBAC₄(3)) を用いて細胞膜電位を測定したところ, 2K1C群では100 μ M Ba^{2+} による脱分極反応が有意に減弱した。ホールセルパッチクランプ法で膜電流を測定した結果, sham群では-40 mVより過分極側で Ba^{2+} 感受性内向き電流が観測された。一方, 2K1C群では同内向き電流成分は観測不能な程度微弱であった。抗体免疫染色法でKir2.1チャネルのタンパク発現を調べたところ, sham群において細胞膜での発現が観察されたが, 2K1C群ではほとんど観察されなかった。以上より, 腎血管性高血圧症の発症マウス腸間膜動脈平滑筋において, Kir2.1の機能発現が低下していることが明らかとなり, 血管平滑筋の興奮性上昇及び血圧調節機構の変化に一部寄与している可能性が示唆された。

05-1 進行糖尿病における胃運動機能の検討

名古屋市立大学大学院医学研究科消化器・代謝内科学

○神谷 武, 加藤 岳史, 鹿野美千子, 田中 守, 塚本 宏延, 尾関 啓司, 海老 正秀,
溝下 勤, 森 義徳, 谷田 諭史, 片岡 洋望, 今枝 憲郎, 城 卓志

【背景および目的】糖尿病の進行例には種々の消化器症状が出現することが知られている。糖尿病での消化管運動機能の検討は従来から行われており, 胃排出遅延の報告もみられる。また合併症のひとつとして糖尿病性胃症の概念も提唱されている。しかしこれまで, 複数の運動機能検査を同時に測定した報告は少ない。今回, 進行糖尿病を対象に経皮的胃電図 (Electrogastrography: EGG) と胃排出能を同時に測定し, 消化器症状との対比をおこなった。

【方法】対象は, 糖尿病コントロール目的, 消化器症状精査, あるいは糖尿病性網膜症治療目的で当院に入院した21名 (男性8名, 女性14名, 33~80歳) である。全例インスリン治療中で, 合併症の眼症, 腎症, 神経障害のうち少なくとも一つは有していた。また年齢, 性のマッチした健常者15名にも, 同様に胃排出能を測定しコントロールとした。胃運動機能の測定にはEGGと¹³C-オクタン酸呼吸試験による胃排出能検査を用いた。¹³C-オクタン酸100 mgを含有した液体流動食 (ラコール^R, 200 ml, 200 kcal) を, ゼラチンで固形化し試験食として用いた。EGGは試験食摂取前後それぞれ30分間臥位で測定し, % of normogastria, パワー比を評価項目とした。呼吸の採取は, 試験食摂取後90分までは15分間隔で, それ以降は30分間隔で摂取後4時間まで行い, Ghooosらの方法に準じLag Time, Half-Emptying Timeを算出した。

【結果】糖尿病群では健常群に比し, EGGの% of normogastria, パワー比の低下および胃排出の遅延を認めた。個々の症例をみると, 21名中15名にEGG, 胃排出のいずれかあるいは両者の異常を認めた。糖尿病群では, 上腹部痛, 悪心, 食欲不振, 腹部膨満感などの上部消化管症状を21名中16名に認めた。このうち3名の胃運動機能は正常で, 13名に胃運動機能異常を認めた。

【結論】糖尿病の進行例では約70%に胃運動機能障害を認め, 消化器症状と関連する可能性が疑われた。しかしそれにあてはまらない症例もあり, 病態の多様性も示唆された。

05-2 流動食中のグルタミン酸による糖代謝・インクレチンの分泌

¹群馬大学大学院病態制御内科, ²群馬大学医学部附属病院光学医療診療部

○保坂 浩子¹, 草野 元康², 財 裕明¹, 川田 晃世¹, 栗林 志行¹, 下山 康之¹,
名越 淳人¹, 前田 正毅¹, 茂木 文孝¹, 堀越 勤¹, 河村 修¹, 森 昌朋¹

【目的】L-monosodium glutamate (MSG) はうま味調味料として一般に使用されるアミノ酸化合物で、内外分泌や消化管運動に影響を及ぼす物質である。以前、我々は MSG が高たんぱく液状食の胃排出を促進することを報告した (Am J Clin Nutr 2009)。今回、脂肪含有流動食に添加された MSG が、食後の糖代謝 (インクレチンを含む)、胃排出に与える影響について検討した。

【方法】健康人男性 ($n=13$, 25.5 ± 3.6 歳) を対象とし、400 ml (520 kcal: うち脂肪 100 kcal) の液状試験食を用い 13C 呼吸試験 (Breath ID system) による胃排出測定を 2 回行い、1 回には MSG (2 g, 0.5% wt/vol) を、もう 1 回は NaCl を添加した。血糖、インスリン、グルカゴンを試験食摂取後 240 分まで、glucagon like peptide-1 (GLP-1)、glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) を摂取後 120 分まで経時的に測定した。

【結果】試験食摂取後、MSG 添加時にはインスリン濃度のピークが有意に早くなった (MSG: 39.2 ± 5.2 min, NaCl: 53.1 ± 7.3 min, $p=0.048$)。また、血糖は摂取後 30 分に MSG 添加時に低い傾向を示し (MSG: 58.8 ± 4.4 mg/dl, NaCl: 68.2 ± 4.3 mg/dl, $p=0.045$)、最初の 60 分の Area under the curve (AUC) も有意に低くなっていた (MSG: 40.6 ± 3.51 mg · 1 hr/dl, NaCl: 49.2 ± 3.86 mg · 1hr/dl, $p=0.047$)。摂取後 240 分までのインスリン総分泌量 (AUC) に有意差は認めなかった。グルカゴンは食事摂取により抑制されるが、MSG 添加時には早期に回復しベースラインに戻り食後 120 分では MSG 添加時に有意に高値となっていた (MSG: 0.31 ± 4.68 pg/mL, NaCl: -14.85 ± 2.95 pg/mL, $P<0.01$)。GIP は MSG 添加の有無による変化は認められなかったが、GLP-1 は MSG 添加時には食後早期に高く徐々に低下していくのに比べ、NaCl 添加時には徐々に増加し、食後 30 分では MSG 添加時に有意に高かった (MSG: 58.1 ± 15.8 pmol/L, NaCl: 13.4 ± 15.8 pmol/L, $p=0.035$)。胃排出や食後の腹部感覚には MSG 添加による変化は見られなかった。

【結論】MSG は脂肪含有流動食摂取時にインスリンの総分泌量を変えずに分泌のピークを早めた。これらは胃排出を介したのではなく、GLP-1 の分泌様式の変化が一因となっている可能性が示唆された。

05-3 飲水試験を用いた duodenal break 検出の可能性

¹横浜市立大学附属病院消化器内科, ²横浜市立大学附属病院臨床研修センター

稲森 正彦^{1,2}

【背景】上部消化管の機能、特に胃の反応性弛緩を測定する方法としてはバロスタットを用いる方法がゴールドスタンダードである。しかしバロスタット法には検査の認容性、検査機器の経済性など幾つか問題があり、代わりの簡便な方法として飲水試験が考案されてきた。Boeckxstaens の方法はノンカロリーで急速飽和を特徴とする試験である。

【目的】今回我々はプロトコルを工夫することで飲水試験により duodenal break を検出できないか検討した。

【方法】消化器症状がなく、定期的服薬もない、21-34 歳の健康人男性ボランティア 8 名を対象とした。プロトコル A とプロトコル B にて crossover study を行った。

プロトコル A: 開始 4 分まで 1 kcal/ml の栄養剤を摂取後に一旦中断し、30 分後に再開。

プロトコル B: 開始 4 分まで水を摂取後に一旦中断し、30 分後に再開。

試験は Boeckxstaens の方法に従い、8 時間の絶食後、室温のミネラルウォーターを用いて 1 分間に 100 ml の速度でストローを用いて行った。検査食摂取前、飲水テスト開始前、開始より 1 分毎、1 時間後、2 時間後に問診表を施行し、どれか 1 項目が 5 点、ギブアップ、飲水量 2,000 ml のいずれかで飲水終了とした。

【結果】全員が副作用なく検査を完遂した。プロトコル B (1,850 ml [1,500-2,000]) に比べプロトコル A (1,650 ml [1,400-1,800]) における最大飲水量は減少した ($p=0.0083$)。症状の推移においては統計学的有意差を認めなかった。

【考察】一般健康人において、飲水試験途中の 30 分の休憩をはさみ、400 ml/400 kcal の栄養負荷は同量の水負荷と比べ最大飲水量を減少させた。Duodenal break, Nutrition induced accommodation 及びそれに伴う知覚過敏を検出している可能性が示唆された。しかし結果をもたらし詳細な機序、臨床的意義は不明であり、今後の更なる検討が必要である。

05-4 内視鏡でヘルマン線の同定は可能か（第2報）

¹横浜市立大学附属病院 消化器内科, ²横浜市立大学附属病院 臨床研修センター

稲森 正彦^{1,2}

【背景】上部消化管内視鏡検査において、胃食道接合部付近の扁平上皮と円柱上皮の境界は比較的明瞭に同定できる。下部消化管内視鏡検査においても肛門付近においてその境界は明瞭であり、歯状線として認識できる。一方、食道下部括約筋の高圧帯は5 cmほどであるとされるが、その上端は食道内圧検査でのみ同定され、内視鏡で同定することができない。しかし下部の場合、扁平上皮、移行帯上皮、円柱上皮と移行するため、粘膜面からの内視鏡観察で同定できる可能性がある。実際同定が容易であるとする見解もある。またルゴール散布の有用性が少数報告されているが、その評価は定まっていない。

【目的】内視鏡観察下でヘルマン線の同定が可能かどうか再検討する。

【方法】平成23年11月1日より横浜市立大学附属病院において便潜血陽性あるいは大腸ポリープの既往にて下部消化管内視鏡検査を受けた症例のうち、同意の得られた連続12名について解析した。前処置は前日検査食、眠前センノシド(12)3錠、朝よりムーベン2L、残渣が無くなった時点で検査を開始した。盲腸まで観察の後、最後に直腸にルゴールを20 mL散布し観察を行った。観察は適時反転法を用いた。なお拡大観察は用いなかった。

【結果】年齢は56-79歳、全例、直腸ポリープ、直腸がんは認められなかった。12例ともはっきりと境界を同定することはできなかった。なおルゴール散布にて症状は殆ど認められなかった。

【考察】既報を参考に推察した場合、ルゴール染色性の濃淡によりヘルマン線が同定できる可能性が示唆されていたが、通常の検査に加えルゴールを散布するだけでは難しいことが判明した。文献的な考察を加え報告する。

06-1 血管平滑筋異常収縮新規シグナル候補分子の絞り込みのための、自動細胞イメージングシステムによる、ハイスループットかつ定量的なスクリーニング系の開発

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

○岸 博子, 徳森 大輔, 加治屋勝子, 高田 雄一, 川道穂津美, 宮成 健司, 木村 友彦, 張 影, 小林 誠

Rho キナーゼを介した血管平滑筋のCa²⁺感受性亢進は、血管攣縮を引き起こす血管平滑筋異常収縮において、重要な役割を果たす。これまでに我々は、血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達経路として、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC)/Fyn チロシンキナーゼ/Rho キナーゼ経路を見出した。更に、SPCで刺激されたヒト血管平滑筋からチロシンリン酸化蛋白を抽出して解析した Focused Proteomics により、21 個の Fyn の下流候補分子群を同定し、うち6個は細胞骨格関連因子であった。これらの候補分子群が真に血管平滑筋異常収縮に関与するかを客観的に解析するには、全ての候補分子の組換え蛋白を作成し、スキンド血管平滑筋で検討する方法が確実であるが、高い技術力を必要とする上、非常に時間がかかる。一方、通常の蛍光顕微鏡で血管平滑筋細胞の形態と細胞骨格を観察する方法では、高度な技術力は不要であり、時間も節約できるが、観察できる細胞数が限られ、更に、観察者の主観を避ける事が極めて困難である。そこで、本研究では、自動細胞イメージング装置 (ArrayScanV) を用い、SPC 刺激による細胞収縮と細胞骨格構築の変化を、ハイスループットかつ客観的に自動・定量解析するシステムの構築を目指した。ヒト冠状動脈平滑筋細胞を、96-well プレートに培養し、SPC 刺激後、多重蛍光標識した細胞体、F アクチン、中間径フィラメントの画像を自動的に取得した。一回の解析で1 well あたり 200-400 個の細胞の画像を自動取得し、独自のアルゴリズムによって、SPC 刺激による血管平滑筋細胞収縮と細胞骨格構築の変化を客観的かつ定量的に評価する事ができた。更に、このシステムと RNA 干渉を組み合わせる事により、候補分子の一つである hk002 が血管平滑筋異常収縮に関与する可能性が示唆された。

O6-2 磁気インピーダンスセンサーによる平滑筋細胞組織計測と最近の高精度化

¹名古屋大学・大学院医学系研究科・細胞生理学, ²名古屋大学・大学院工学研究科・電子情報デバイス,
³フジデノロ(株)・技術開発部

○中山 晋介¹, 熱田 諭志^{1,3}, 内山 剛²

電氣的興奮性を有する全ての生命システムは同時に磁界を発生する。これまで、フェムトテスラレベルの感度を有する磁気センサーである超伝導量子干渉デバイス(SQUID)のみがこの目的で生体へ応用された。脳磁図、心磁図などがその例である。しかしながら、超伝導原理に基づく技術は超低温環境を要求するので、通常、液体ヘリウムなど冷却溶媒コンテナ中に格納される。そのため、システム全体が大がかりとなり、小さな生体標本の計測には不向きである。また、一般社会での利用を阻む要因となっている。

そこで、私たちは、モバイルフォンの磁気コンパスとしても内蔵できるパルス励起型磁気インピーダンス(pulse-driven magnetoimpedance: PMI)センサーの感度をサブナノテスラレベルへ向上させることにより、実験動物より摘出した平滑筋組織(モルモット胃、膀胱、盲腸紐等)が発生する活動磁界の計測に成功した。計測信号のヒストグラム解析から検出限界は約 0.25-1 μA であった。平滑筋細胞は電氣的に結合しており(Abe & Tomita 1968, *J. Physiol* **196**, 87), また Bolton (1975, *J. Physiol* **250**, 175), 猪俣ら(1976, *J. Physiol* **255**, 347)は、スクロースギャップの実験において 0.5 mm 程度の標本に活動電位を発生するために数 μA の電流が必要であると報告しており、その結果とも符合する。

私たちは、グラジオタイプセンサーとして高精度の差動増幅を行うことが可能となる、極めて相同な誘導起電力を発生するペア MI 素子を最近作製した。この応用についても報告する。

O6-3 ミオシン II 阻害薬によるスキンド平滑筋弛緩過程

¹首都大学東京・人間健康科学研究科, ²慈恵医大・麻酔科, ³慈恵医大・産婦人科

○渡辺 賢¹, 山村 聡¹, 湯本 正寿², 中野 真³

平滑筋は、骨格筋に比べミオシン II 阻害薬 blebbistatin 感受性が低く、収縮抑制が起こりにくいと考えられてきた。しかし、収縮抑制程度は弱いにせよ、平滑筋においても blebbistatin は 10 μM 以下でアクトミオシン ATPase 活性、収縮張力を抑制するとともに、収縮フィラメント配列を攪乱した(Watanabe et al. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**: C1118-26, 2010)。そこで、今回、ミオシン II 阻害薬の平滑筋収縮・弛緩サイクルへの作用点解明を目的として、スキンド盲腸紐 Ca^{2+} 活性化収縮後の弛緩経過に与える blebbistatin および速筋型骨格筋への選択性が高いミオシン II 阻害薬 N-benzyl-p-toluenesulfonamide (BTS) の影響を検討した。Blebbistatin は 3 μM 以上で有意に弛緩を促進し、30 μM 投与時にはその弛緩促進効果が Ca^{2+} 除去後 40 秒で出現した。高濃度(1 mM)の BTS でも同様の弛緩促進効果が観察された。弛緩経過の回帰分析より、blebbistatin は活性化クロスブリッジ解離後のラッチ形成を抑制すると共に、ラッチ解離を促進することが示唆された。

O6-4 T細胞性白血病細胞株のCD3の膜表面発現におけるミオシン軽鎖（MYL9）の関与について

北里大学医学部血液内科学

○青木 卓巳, 渡邊 真理子, 宮崎 浩二, 堀江 良一, 東原 正明

【緒言】我々は第52回, 第53回の本学会において, 血液細胞から同定した調節型ミオシン軽鎖の一つである MYL9 が, T細胞性白血病細胞株である Jurkat 細胞の主要な表面抗原マーカーである CD3 の膜表面発現に関与していることを示唆する実験結果を発表した. 今回, MYL9 に対する siRNA を用いた実験結果を踏まえ報告する.

【方法】① RT-PCR にて MYL9 を発現していない Jurkat 細胞と, 強制的に MYL9 を Jurkat 細胞にトランスフェクションし大量発現させ作製した Jurkat-I とにおける CD3 (PE) の膜表面発現率をフローサイトメトリー (FCM) で測定した. ② 膜表面に CD3 の強発現 (97.8%, 平均蛍光強度 (MFI)=41.9) を認める Jurkat, Clone E6-1 では RT-PCR にて MYL9 の発現が認められた. そこで, Jurkat, Clone E6-1 に MYL9 に対する siRNA をトランスフェクションし 24~48 時間後での CD3 (PE) の膜表面発現率を FCM で測定した.

【結果】① Jurkat 細胞では CD3 の膜表面発現率が 16.0% (MFI=1.16) であるのに対して, Jurkat-I では 86.6% (MFI=7.48) と発現増加を示した. ② siRNA をトランスフェクションした Jurkat, Clone E6-1 の CD3 の膜表面発現率は 96.0% (MFI=27.5) であった.

【考察】①の結果から CD3 が膜表面に発現するには MYL9 の遺伝子発現が必要と考えられる. 一方で, ②の結果から CD3 の膜表面発現後に MYL9 の発現を抑制しても CD3 発現を抑制させることは出来ない. これより, T細胞性白血病細胞株において CD3 を膜表面に発現させる機序として, MYL9 の発現が必要であると同時に, MYL9 以外の何らかの因子の存在が必要であり, それらの相互作用によって CD3 を膜表面へ誘導発現させていると考えられた.