

招待講演

**PMCA, SERCA and Na, K ATPase Alpha Isoforms and
Ca²⁺ Homeostasis in Smooth Muscle :
Evidence from Gene-Altered Mice**

Departments of Molecular and Cellular Physiology, Pharmacology and
Cell Biophysics and Molecular Genetics.
University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, Ohio 45267-0576, USA.

**Richard J. Paul, Koji Nobe, Evangelia Kranias,
Gary Shull and Jerry Lingrel.**

Maintenance and modulation of $[Ca^{2+}]_i$ is of central importance in regulation of vascular contractility. Key to setting steady states are the plasma membrane (PMCA) and sarco (endo) plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) pumps, the SERCA modulator phospholamban (PLB), and Na, K ATPase coupled to the Na-Ca exchanger. The relative roles played by each in Ca^{2+} homeostasis is unknown, and further complicated by the existence of isoforms (PMCA1-4, SERCA1-3, Na,K ATPase alpha1-4 and multiple potential splice variants of each). Interestingly, further variety can be introduced by specialized localization, such as the unique subsarcolemmal localizations of the alpha1 and alpha2 Na, K ATPase isoforms. Gene-targeted and transgenic mouse models provide unique models to evaluate the role played by these pumps in regulation of vascular smooth contractility, and include SERCA2, 3, PLB, PMCA1 & 4 and Na, K ATPase alpha1 & 2 Isoform knockouts. Modulation of SERCA by PLB can be a major factor in contractility in both tonic and phasic smooth muscles, as shown by PLB-KO or mice expressing the PLB transgene in smooth muscles. In contrast, little change in contractility in the SERCA2+/- was found. Contractility in PMCA1+/- was elevated whereas in PMCA4-/-, paradoxically, little change was noted. Alpha 2-/- Na, K ATPase KOs showed increased contractility, but not alpha1+/-, which has similar decreases in total Na, K ATPase. $[Ca^{2+}]_i$ measurements suggest a general pattern in which minor changes in Ca^{2+} homeostasis are reflected in contractility. However, major disruptions lead to altered Ca^{2+} -sensitivity, such that the stimulus-force relations are maintained. Thus it appears that Ca^{2+} homeostasis and Ca^{2+} sensitivity of the contractile apparatus are intertwined and coordinately regulated.

特別講演 1

細胞内シグナルの可視化

東京大学・医・細胞分子薬理学

飯野正光

細胞内では、様々な分子が情報をやり取りして細胞機能を調節している。ある細胞機能が発揮されている時、細胞内でどのような分子間の相互作用があり、どのように情報が伝達されているのか？ これを目の当たりにできたらどんなにすばらしいだろうかという願いは、多くの研究者の夢であった。この夢が、今少しづつかなえられてきている。もちろん、すべてが手に取るように分かるというところまでに達するにはまだ時間が必要ではあるが、部分的にしる確実に細胞内での情報の流れを目で見る（可視化する）ことが可能になってきている。

このような可視化法が最も早く導入されたのは、細胞内 Ca^{2+} シグナルである。Roger Tsien の開発した Fura-2 などの蛍光 Ca^{2+} 指示薬と、故 Fred Fay によって生物に導入された digital imaging 法により、単離平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が Nature 誌に掲載されたのは 1985 年のことである。その後、 Ca^{2+} イメージング法は急速に様々な細胞系に適用された。私たちは、血管組織の Ca^{2+} イメージングを初めて行い、個々の血管平滑筋細胞内で Ca^{2+} ウェーブやオシレーションが生じていることを明らかにした (EMBO J., 1994)。このような組織レベルの観察により、内皮細胞と血管平滑筋細胞の相互作用についても、 Ca^{2+} シグナルレベルで明らかにした (J. Physiol., 1995)。また、外来刺激がない状態でも血管平滑筋細胞に、 Ca^{2+} リプルや Ca^{2+} フラッシュと私たちが命名した自発的な Ca^{2+} 濃度上昇が見られることを明らかにした (J. Physiol., 1999)。引き続き私たちは、組織レベルの Ca^{2+} イメージングを消化管にも応用している。消化管では自発的な脱分極（スローウェーブ）が存在し、このペースメーカーとしてカハール細胞が有力視されている。私たちは、カハール細胞と隣接する消化管平滑筋細胞の同時 Ca^{2+} イメージングを行い、2 種の細胞間の相互作用について解析を進めている (J. Physiol., 2002)。

このように、 Ca^{2+} シグナルの可視化法は、細胞内におけるダイナミックな Ca^{2+} シグナルの動きを明確にした。さらに、 Ca^{2+} シグナルの意義が、単にカルシウム濃度の時間経過だけではなく、細胞内における分布や局在が重要であることが現在までに認識されている。私たちは、 Ca^{2+} シグナル研究で高い有用性を示した可視化法を、他のシグナル分子にも適用できるようにする必要があると考えている。このためには、シグナル分子可視化のためのインジケーターが必要であり、私たちは、 Ca^{2+} シグナルに関連するイノシトール三リン酸 (Science 1999)、一酸化窒素、転写因子 NFAT などを細胞内で可視化するためのインジケーターの開発を進めている。これまでに、これらの新しいインジケーターを培養細胞系や中枢神経系に応用して、全く新たな知見を得ることに成功している (Neuron 2001)。今後、これらが平滑筋細胞に応用されれば、平滑筋研究に新たな展開をもたらしてくれるものと期待している。本講演ではこれらの新しいシグナル分子のインジケーターの現状と可能性について紹介したい。

特別講演 2

気管支喘息の病態と治療 — 気管支平滑筋の重要性 —

昭和大学・医・第一内科

足 立 満

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であり、多くの細胞や細胞成分が関与している。気道炎症は、中枢気道から末梢気道においても認められ、さらには、気道内側ばかりでなく気道の外壁にも炎症が存在している。この慢性炎症により気道過敏性が亢進し、繰り返す息切れ、呼吸困難感および夜間や早朝の咳や痰などの喘息症状が引き起こされる。また、気道平滑筋層内の肥満細胞数と気道過敏性の程度が相関すると言った報告もある。喘息患者における気道過敏性亢進には、気道平滑筋の収縮性と表現形の変化が関与する。実際、喘息患者の気管支平滑筋の等張性収縮を測定すると、その短縮性は増強しており、さらに肺生検組織から分離された気道平滑筋を培養すると、細胞増殖反応が健常人と比較して亢進している。気道平滑筋の収縮、気道壁の腫脹、気道分泌亢進、および気道炎症が遷延すると気道平滑筋の増殖肥厚や基底膜下網状層の肥厚などの気道壁リモデリングによる気流制限が引き起こされる。気道壁リモデリングの進行は、気道に不可逆性の気流制限を誘導し、気道の過敏性をさらに亢進させ、喘息の重症化や難治化をもたらす。重症喘息患者における肺生検の結果からは、気道閉塞に関与する因子は気管支平滑筋の肥大と線維芽細胞の数であった。

ロイコトリエンは、ヒスタミンと比較して約 1000 倍強力な気管支平滑筋収縮作用を有し、喘息の病態において重要な化学伝達物質である。気管支平滑筋自体もロイコトリエンを産生し、また細胞表面上にロイコトリエン受容体を発現している。気道炎症部位では IL-4 や IL-13 などのサイトカインが産生されており、これらのサイトカインはロイコトリエン受容体の発現量を増加させる。また、ロイコトリエンは気管支平滑筋の細胞増殖反応を亢進させる作用も有している。これらの結果より、ロイコトリエンは気管支平滑筋の増殖と肥大に関与していることが強く示唆される。実際、マウスの喘息モデルにロイコトリエン受容体拮抗薬を投与すると、気管支平滑筋の肥大や気道の線維芽化が抑制される。以上より、ロイコトリエン受容体拮抗薬は気道壁リモデリングの予防に有効である可能性が存在する。

最近では、気管支平滑筋自体がサイトカインやケモカイン、さらに化学伝達物質などを産生し、喘息においてエフェクター細胞として重要な役割を果たしていることも示唆されている。肺生検組織から分離された気管支平滑筋を TGF- β で刺激すると、喘息患者と健常者よりも connective tissue growth factor の産生が亢進している。今後は、気道平滑筋をターゲットとした治療が、気管支喘息における気道壁リモデリングを予防する有効な治療法になると考えられる。

会長講演

単離平滑筋細胞の誕生

昭和大学・薬・薬理学

百瀬和享

平滑筋の収縮機構解明には、できるだけ無傷の状態で摘出した筋組織の収縮反応を等張的 (isotonic) あるいは等尺的 (isometric) に記録して解明の手がかりを得てきた。しかし、平滑筋組織は複雑なために得られる情報が必ずしも筋細胞の収縮反応を反映しているとは限らない。そこで、1 個の平滑筋細胞の収縮反応の測定が試みられるようになり、Bagby や Fay らはガマ胃から単離した平滑筋細胞が収縮することを報告した。しかし、医薬品の平滑筋に対する作用解明には、哺乳動物平滑筋細胞の単離が望まれていた。

以上の経緯から、平滑筋の研究材料に最も多く用いられているモルモット結腸紐平滑筋について、単離とその薬理学的研究への応用を試みた。その結果、papain と collagenase を組み合わせることで収縮能を保持した細胞の調製に成功し、単離した細胞の収縮反応は組織の反応とほぼ同様であることを明らかにした。この単離法は多くの平滑筋研究者に注目され、様々な組織で試みられるようになった。また、単離平滑筋細胞はパッチクランプの実験に広く用いられるようになった。

さらに、単離した平滑筋細胞を培養して種々の実験への応用を試みたところ、調製直後の平滑筋細胞は収縮能を保持しているが、培養すると細胞は収縮型 (分化型) から増殖型 (脱分化型) へ形質転換して収縮能を失うことが明らかとなった。そこで、単離した細胞を培養して収縮能とタンパク質との変化を経時的に観察し、収縮に関わるタンパク質の解明を行っている。

本講演では、単離細胞調製法の詳細と培養したときの収縮に関わるタンパク質の変化について述べる。

S1-1. エンドセリンの心血管系における作用とその分子機構

北海道大学・医・細胞薬理学

三輪 聡一, 滝川 修, 深尾 充宏

エンドセリン (ET) は強力な血管収縮性ペプチドであり, 一部の高血圧, 脳血管攣縮, 心不全などの発症において重要な役割を果たしていると考えられている. ET は血管平滑筋細胞や心筋細胞の細胞膜に存在する特異的な受容体 (ET_A および ET_B 受容体の 2 種類) を介してその作用を発現する. 血管平滑筋細胞の ET_A 受容体を刺激すると収縮および細胞増殖をきたすが, これは主として細胞外からの Ca 流入による. この Ca 流入への電位依存性 Ca チャンネルの関与はほとんど認められず, いわゆる受容体作動性 Ca チャンネルを介する. ET により活性化される Ca チャンネルを明らかにするために, クローン化 ET 受容体を発現させた哺乳類系統細胞および血管平滑筋細胞において, パッチクランプ法を行った. その結果, いずれの細胞においても合計 3 種類の Ca 透過性チャンネル—2 種類の Ca 透過性非選択的陽イオンチャンネルおよびストア作動性 Ca チャンネル—が活性化されることを見出した. また, これら 3 種類の Ca 透過性チャンネルは従来 “いわゆる受容体作動性 Ca チャンネル” の遮断薬として一括されていた SK & F 96365 および LOE 908 という 2 つの薬物を用いることにより薬理的に完全に区別できることがわかった. これらのチャンネルの活性化機構, 特に関与する G 蛋白質を明らかにするために, 特定の G 蛋白質とのみ共役する変異 ET 受容体および G 蛋白質の dominant-negative 変異体を用いて検討し, それぞれのチャンネルは異なる G 蛋白質を介して活性化されることを示した. 上記の薬物を用いて, これらのチャンネルの生理・病態的意義を検討した結果, 脳血管攣縮・動脈硬化症・心不全における関与が明らかとなった. また, ET をはじめとするペプチド性アゴニストは脱感作を起こすことがよく知られているが, その分子機構についても言及する.

S1-2. 血管リモデリングにおけるエンドセリン受容体と創薬

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所

東 洋

ウサギ総頸動脈内皮剝離後の血管壁において惹起される増殖性変化について Ki-67 陽性細胞の発現を指標として検討した結果, 剝離 24 時間以後 1 週にわたって経時的に増加したが, その後激減し, 6 週後には消失していた. 細胞外基質の一つであるエラスティンの発現は剝離 4~6 週後に到ってはじめて顕著となり, この時期に血管リモデリングは完了した. 一方, 新生内膜における TUNEL (DNA 断片化の指標) ならびに p 53 (アポトーシス促進蛋白) 陽性細胞数は 48 時間以後 2 週にわたって経時的に増加したが, 以後激減し, 6 週後には消失していた. すなわち, 内皮剝離後の血管リモデリング過程においては細胞増殖亢進とアポトーシスとがほぼ同期して起っていることを示唆する. 再生内皮細胞内に内因性 NOS 阻害因子 (L-NMMA と ADMA) が高濃度に蓄積するために, NO 産生は著しく低下していた. その結果, 血管壁でのエンドセリン-1 (ET-1) 含量が著明に増加した. ET-1 受容体 (ETR) の分布密度も増加していた. 培養血管平滑筋細胞において ET-1 は, [³H]-thymidine 取込みを亢進するとともに血清除去によるアポトーシス亢進に対して抑制的に作用した. すなわち, 血管リモデリング過程における ET-1 ならびに ETR の重要性が示唆された. ETR 拮抗剤の構造—活性相関について検討した結果, ATZ1993 を発見した. ATZ1993 は経口投与可能な非ペプチド性の新規な化合物である. 内皮剝離後の内膜肥厚ならびに PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) 陽性細胞の発現は ATZ1993 によって著明に抑制された. また, TUNEL ならびに p 53 陽性細胞数の著明な増加と bcl-2 (アポトーシス抑制蛋白) 陽性細胞数の減少を来した. 以上の事実から, 細胞増殖亢進とアポトーシス抑制という dual action を介して ET-1 が血管リモデリング過程において重要な役割を演じると考えられた.

S1-3. 膀胱のムスカリン受容体サブタイプの役割と創薬

日本ペーリンガーインゲルハイム 川西医薬研究所¹, 福井医科大学・薬理学²

喜多川 久人¹, 村松 郁延²

切迫性尿失禁および Overactive bladder の治療には過剰な膀胱の収縮を抑制するために、抗ムスカリン薬が広く使われている。膀胱平滑筋にはムスカリン M2, M3 受容体が分布しており、M2 の分布が優位であると報告されている。しかし、薬理的には収縮は主に M3 により起こるとされ、M3 選択的拮抗薬が開発されてきている。今回は摘出膀胱の収縮およびにラット Cystometry おける各ムスカリン受容体サブタイプの役割について検討を行った。また、治療薬の評価には一般にラットが用いられているが、ラットの膀胱の反応性がヒトに類似しているかどうかの検討も行った。摘出膀胱における Carbachol 収縮の用量反応曲線は、いずれの薬物によっても用量依存的に右方に移動し、その pA₂ は Atropine 8.8, Tolterodine 8.1, Oxybutynin 8.0, Pirenzepine 7.0, AF-DX 116 6.2, Darifenacin 8.3 であった。これらの薬物の pA₂ 値から膀胱の収縮には M3 受容体サブタイプが関与していることが示唆された。麻酔下ラットの排尿反射圧は非選択性抗ムスカリン薬の Atropine, Tolterodine, Oxybutynin によりいずれも強く抑制された。一方、M1, M2, M3 受容体のそれぞれの選択的拮抗薬の Pirenzepine, AF-DX 116, Darifenacin も用量に依存して、排尿反射圧を抑制した。しかし、非選択性抗ムスカリン薬に比べ、その最大抑制率はいずれの薬物も 60% 以下と弱かった。また、経壁電気刺激による摘出膀胱の収縮もいずれの薬物により、用量依存的に抑制された。しかし、M1, M2, M3 選択性拮抗薬も単独では最大抑制を惹き起こすことはできず、非選択性抗ムスカリン薬の効果に比べ弱かった。しかし、サブタイプ選択性拮抗薬の組み合わせは、最大抑制を惹起した。以上の結果より、ラット膀胱平滑筋の収縮には M3 サブタイプだけでなく、他のサブタイプも関与していることが示唆された。

S1-4. ヒスタミン潰瘍の発生機序におけるラット胃血管平滑筋の役割

京都薬科大学・応用薬理学

岡部 進, 天ヶ瀬紀久子

実験潰瘍モデルの一つにヒスタミン潰瘍があるが、演者らは胃に走行する血管の一部を結紮し、胃粘膜の一部を虚血状態にしたラットにヒスタミンを投与した結果、胃体部に広範な胃粘膜損傷が発生することを見出した。このヒスタミン胃損傷の成因を血管平滑筋との関連で検討した。エーテル麻酔下に、絶食したラットの左胃動静脈及び胃幽門部を結紮し、ヒスタミン 40 mg/kg を結紮 10 分及び 2 時間後に計 2 回皮下投与した。剖検し、損傷面積を測定し、胃液酸度を測定した。血管結紮単独では胃粘膜に損傷は殆ど発生しなかった。ヒスタミン誘起胃損傷は、インドメタシン、L-NAME、ヒスタミン H₁ および H₂ 受容体拮抗薬の前投与により有意に抑制された。この事実は、内因性 PGs 及び NO が損傷の発生に関与していることが示唆された。しかし、ロフェコキシブ (Cox2 阻害薬) では、抑制効果は認められなかった。エンドセリンは、胃粘膜下に注入すると注入部位を中心に損傷を誘起するが、この成因は、エンドセリンの血管平滑筋に対する強力かつ持続的な収縮の結果と推定されている。左胃動静脈を結紮したラットにおいても、エンドセリンの粘膜下注入は同様な損傷を誘起した。一方、血管結紮ラットに誘起されるヒスタミン損傷は、エンドセリンの前処置により、有意に抑制された。これらの事実から、血管結紮ラットにおける胃損傷は、血管結紮による胃の一部虚血直後、ヒスタミン投与により右胃動脈から胃内に到達したヒスタミンが胃微小血管を拡張し、酸素供給量が組織局所において急激に増加し、いわゆる虚血再灌流様状態が誘起されたことにより、組織傷害が発生したものと考えられる。

S1-5. 血管平滑筋とプロスタノイド

旭川医科大学・薬理学

牛首 文隆

プロスタノイドは、プロスタグランジン (PG) とトロンボキサン (TX) より成る、一群の生理活性脂質である。また、その作用は、標的細胞表面に存在する各々のプロスタノイドに特異的な受容体を介して発揮される。従来、プロスタノイドの血管平滑筋に対する収縮・弛緩作用が精力的に解析されてきた。しかし、血管におけるプロスタノイド受容体の発現分布やプロスタノイドの病態生理的役割には、不明な点が多く残されている。今回、各プロスタノイド受容体を欠損するマウスを用いた、血管平滑筋におけるプロスタノイドの作用の解析結果を紹介したい。まず、マウス大動脈平滑筋でのプロスタノイド受容体の発現や、プロスタノイドの大動脈に対する収縮・弛緩反応を検討した。また、血管平滑筋細胞の増殖・肥大に対するプロスタノイドの作用を明らかにした。一方、プロスタノイドの血管平滑筋を場とした病態生理的役割についても解析を行った。まず、プロスタグランジン I₂ の血管平滑筋細胞に対する増殖抑制作用に焦点をあて、その生体での役割を解析した。方法として頸動脈結紮モデルを用い、血管リモデリングにおける PGI₂ の役割を検討した。その結果、PGI₂ 受容体欠損マウスでは、野生型マウスに比し著明な血管内膜肥厚の亢進が認められ、PGI₂ が血管リモデリングの場で重要な役割を果たすことが示された。また、レニンが腎血管性高血圧症の病態形成に中心的な役割を果たしており、血管平滑筋が分化した顆粒細胞より分泌される。そこで、プロスタノイドのレニン分泌を介した腎血管性高血圧症の病態形成における役割を解析した。方法として片側腎動脈狭窄術 (2 腎 1 クリップ高血圧モデル) を用いた。その結果、PGI₂ がレニン mRNA の発現を上昇させ、その分泌を促進することにより腎血管性高血圧症の病態形成に重要な役割を果たすことを解明した。

S2-1. Substance P 受容体 (NK₁-R) 拮抗薬の制吐作用とその作用部位

川崎医療福祉大学・臨床栄養学科¹, 同・リハビリテーション学科², 川崎医科大学・生理学³
岡山県立大学短期大学部健康福祉学科⁴

福田 博之¹, 古我 知成², 古川 直裕³, 中村 恵美³, 畑野 瑞恵³, 柳原 衛⁴

【はじめに】次世代制吐薬として期待されている NK₁ 受容体拮抗薬は、動物で、cisplatin, 放射線, 硫酸銅, 吐根, morphine, apomorphine, loperamide および動揺など広範な誘因による前兆現象や嘔吐を抑制する。近年, ヒトでも, 同拮抗薬が, シスプラチンによる急性および遅延性悪心・嘔吐, 術後の悪心・嘔吐および動揺による悪心・嘔吐に有効であると報告されている。私たちは, 同拮抗薬の制吐作用部位が, 除脳イヌによる実験から私たちが提唱している次の嘔吐誘発中枢神経回路の途中に存在することを明らかにした。

【腹部迷走神経求心性線維活動による嘔吐誘発回路】①腹部迷走神経の催吐性求心性線維活動は, ②内側孤束核の二次 neuron により中継されて, ③吻側部疑核背側網様体に存在する嘔吐前兆現象中枢を賦活する。同中枢活動は, 嘔吐前兆現象を発現すると同時に, ④後顔面神経核背内側網様体に存在する嘔吐運動 central pattern generator (CPG) を駆動する。同 CPG は, 各呼吸筋の嘔吐運動の活動パターンを形成すると同時に呼吸中枢を抑制する, ⑤嘔吐運動活動パターンは, 呼吸中枢からの入力から解放された尾側部延髄の呼吸性前運動 neuron を介して, ⑥各呼吸筋運動 neuron を駆動して, 嘔吐運動を発現する。

【結果】嘔吐前兆現象中枢への NK₁ 受容体拮抗薬の微量注入より前兆現象と嘔吐が抑制された。同拮抗薬の静脈注射により, 内側孤束核二次 neuron 活動は影響されなかったが, 前兆現象中枢および嘔吐運動 CPG の neuron 活動は抑制された。前兆現象中枢領域には NK₁ 受容体を発現している neuron が存在した。同 neuron は, 頻回嘔吐を誘発したイヌでは, c-fos も発現した。

【結論】以上により, NK₁ 受容体拮抗薬の制吐作用部位は前兆現象中枢であると結論した。

S2-2. 中枢神経と消化管運動機能の制御と病態について

東北大学・医・心療内科¹, 同・医・人間行動学², 同・医・総合診療部³

庄司 知隆¹, 福土 審², 本郷 道夫³

消化管運動と中枢神経活動とは神経免疫システムにより相互に影響を及ぼし合い, 脳腸相関と呼ぶ。健康者に嚥下させずに味覚刺激のみを与える sham feeding により中枢神経刺激を行うと胃上部の弛緩運動が出現する。さらに, 食事に関連しない刺激として立体映像による視覚刺激を与えると, 同様に胃上部の弛緩運動が出現する。これらは迷走神経あるいは交感神経を介した反応と考えられる。いずれもストレスを自覚しない程度の刺激であることから, 消化管運動は容易に中枢神経の影響を受けやすいと推測される。機能性ディスペプシア (FD) ならびに過敏性腸症候群 (IBS) は機能性消化管障害 (FGID) と総称される疾患群であり, 心理社会的ストレスと消化器症状との関連が指摘されている。しばしば両者は合併し, 全消化管に運動異常を認めることがある。両疾患の 24 時間小腸運動を測定すると, IMC 出現回数は健康者に比して覚醒時には減少するものの, 睡眠時には差を認めなかった。すなわち FGID では小腸運動は中枢神経活動から影響を受け, 運動異常が生じている。アンケート調査から IBS 患者は日々の生活にストレスをより強く自覚している傾向が指摘された。ストレスは視床下部から corticotrophin releasing hormone (CRH) を分泌させ, 様々な生理反応を生じさせる。IBS 患者では CRH 投与により大腸運動の亢進が起こる。すなわち IBS では CRH に対する大腸運動の反応性の亢進が指摘される。また CRH の拮抗薬である α -helical CRH 静脈内投与は, 大腸刺激に対する大腸運動の亢進を抑制し, かつ不安感を軽減した。脳腸相関の改善が IBS 症状の軽減につながる可能性を示すものである。

消化管運動に中枢神経活動が大きく関与している。そのため FGID の病態, 特にその消化管運動障害の機序を解明するためには脳腸相関のメカニズムを明らかにする必要がある。

S2-3. モルヒネ、モルヒネ-6-グルクロン酸 (M-6-G) およびフェンタニルの消化管運動におよぼす影響と薬物投与後の血中アルギニン-バゾプレシン (AVP) 値について

東邦大学・医・一般・消化器外科 (大森)

村國 均, 白倉 立也, 若林 峰生, 柴 忠明

【目的】モルヒネとその代謝産物であるモルヒネ-6-グルクロン酸 (M-6-G) およびフェンタニル投与後の嘔吐反射, レッチングの有無を観察し, 消化管運動への作用と血中アルギニン-バゾプレシン (AVP) へおよぼす影響を検討する。

【方法】ビーグル犬を用いて胃, 十二指腸および小腸運動を strain gauge force transducer 法および筋電図法により測定した。末梢静脈からモルヒネ, M-6-G およびフェンタニルを投与し嘔吐とレッチングの有無, Retrograde Giant Contraction (RGC), Amyogenesis 相の持続時間, Motility Index (M.I) を測定し, 薬物投与前, 投与後 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 分にそれぞれ AVP 値を計測した。

【成績】嘔吐とレッチングは疼痛管理の上で使用する用量に比べ 1/10 以下の低濃度 (M-6-G: 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}\cdot\text{h}$) から発生した。嘔吐に先行し必ず RGC を認めた。異所性の active front (phase 3) を誘発し, いわゆる amyogenesis 相に移行した。Amyogenesis 相は M-6-G, モルヒネの順に用量に応じてみられ最長で 11 時間以上, 持続した。この amyogenesis 相における胃の slow wave をみると bradygastrica, tachygastrica, arrhythmia の各パターンでの dysrhythmia を認めた。

M.I は M-6-G, モルヒネ, フェンタニルの順であった。薬物投与後の経時的な AVP 値をみると正常値の 5 倍以上に増加する例が半数以上にみられた。

【結論】オピオイドは疼痛管理上の使用量より低い濃度で嘔吐を誘発し, 消化管運動への影響は代謝産物の M-6-G の作用が最も強かった。amyogenesis 相の持続時間は用量に応じて遷延し, 胃の dysrhythmia を誘発した。オピオイドによる嘔吐作用は多彩で視床下部—下垂体—副腎系が相互に関与するため副作用対策に難渋すると思われた。

S2-4. Functional dyspepsia の病態への胃十二指腸運動機能からのアプローチ—症状と機能異常—

川崎医科大学・内科学食道胃腸科¹, 同・検査診断学²

楠 裕明¹, 春間 賢¹, 畠 二郎²

【背景】Functional Dyspepsia (FD) は消化管運動機能異常が要因のひとつとして考えられているが, そのすべてに異常が認められる訳ではなく, 機能面からの完全な病態生理の説明には至っていない。【目的】体外式超音波 (US) を用いて胃十二指腸運動機能を複数の要素から検討し, 症状との関連を明確にすることで, その病態解明を試みる。【対象と方法】FD 患者 64 例と無症状健康人 (以下 HC) を対象として, 既報の如くの US 法で運動機能を評価し, 臨床症状も合わせて比較検討した。【結果】空腹期の前庭部横断面積は FD が有意に大きく (FD $1.4 \pm 0.5 \text{ cm}^2$ vs HC $0.8 \pm 0.2 \text{ cm}^2$, $p < 0.05$), 空腹期 phase III 収縮運動の低下が認められた。前庭部横断面積は腹満感と腹痛に関連が強かった。食後期では FD の胃排出能は液体食 (FD $42 \pm 3\%$ vs HC $60 \pm 3\%$, $p < 0.001$), 固形食 (1/2 排出時間; FD 193 ± 78 分 vs HC 141 ± 40 分, $p < 0.05$) とともに HC と比較して有意に遅延した。しかしながら, 胃排出遅延は液体・固形両者を合わせても 60% 頻度であり, 停滞症状を訴える患者に特異的ではなかった。FD の前庭部運動能 (MI; motility index) は液体食で低下し (FD 7.1 ± 0.3 vs HC 8.4 ± 0.2 , $p < 0.005$), 固形食では食後 60 分までが有意に低下したが, この所見は停滞症状に比較的特異的であった。十二指腸胃逆流 (RI; reflux index) は FD で有意に高値であり (FD 17 ± 2 vs HC 9 ± 1 , $p < 0.05$), 特に腹痛患者に多く認められた。さらに, 食後早期腹満感を訴える FD を中心に噴門部弛緩能を検討したが, 飲水後の噴門部横断面積は FD で有意に低く (FD $36 \pm 14 \text{ cm}^2$ vs HC $54 \pm 11 \text{ cm}^2$, $p < 0.05$), 噴門部のリザーバー機能が低下していた。【結語】多要素で評価すると FD には運動機能異常が高率に認められ, 症状と機能異常が一致する群も明らかに存在しており, FD の病態に消化管運動異常が大きく関与している事が考えられる。

S2-5. ^{13}C 呼気試験による胃排出測定～Emptying Pattern と Accommodation～

群馬大学・医・第一内科・光学診療部¹, 済生会川口総合病院², 東海大学³

財 裕明¹, 堀越 勤¹, 下山 康之¹, 草野 元康¹, 森 昌朋¹
名越 淳人², 原澤 茂², 三輪 剛³

【目的】呼気試験による胃排出測定は、その解析方程式からもわかるように排出速度の経時変化、velocity を基本としている。よって“velocity”，すなわち時々刻々と変化する胃排出パターンから胃排出の解析を試みる重要性について検討する。また、より詳細で正確なデータを得るために、世界で2台目、本邦で我々が初めて導入した、連続的に呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ を測定可能とする Breath ID system で得られたデータを供覧する。【方法】既報のごとく、 ^{13}C Octanoic acid 100 mg で標識した 200 Kcal のクッキーを試験食とし、健常人の胃排出データをもとに、ほぼ同等の値を示すパラメーターを示す複数の被検者において、各々の % dose/h 曲線がどのような多様性を示すか、検討を加えている。【結果】同様のパラメーター値を示す被検者の間にも、極めて多彩な % dose/h 曲線を示す場合があった。また、リアルタイム測定による呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 測定は、phasic に変化する胃排出スピード、胃排出パターンの変化を反映していた。【考察】胃排出能を測定する場合、より分かりやすい簡便な指標を用いる事が望ましいのは言うまでもない。しかし我々の検討が示すように、単純な指標は、ともすれば個々が有する固有の消化管機能の特徴をマスクしかねない。【結論】胃排出速度、パターンは時々刻々と移り変わり、さらにその変化が主として上部小腸への刺激の変化として伝わり、feedback され、消化管機能全体の accommodation が決定づけられている。特に機能性胃腸症のように多様な病因、背景を考慮すべき疾患の場合、このような視点からの病態把握が極めて重要であると考えられる。

S2-6. 標準法を用いた ^{13}C 胃排出能検査における T max と T 1/2 による判定の検討

千葉大学・医・腫瘍内科学

宍戸 忠幸, 山口 武人, 尾高 健夫, 瀬座 文香, 相 正人, 三橋 佳苗
山口 和也, 税所 宏光

【背景】我々は、 ^{13}C 胃排出能検査における評価指標として、実測値での呼気中 $^{13}\text{CO}_2$ 濃度がピークを示す時間：T max (peak excretion time) の有用性を報告してきた。また、昨年(2019)の第44回日本平滑筋学会総会ワークショップにおいて、固形試験食と ^{13}C octanoic acid を用いた胃排出能検査では、判定指標が T max に比べ T 1/2 では代謝の影響を受けやすく、両者を用いた判定結果の一致率が70.9%と低いことを報告した。一方、平滑筋学会ワークショップ案として、液体試験食と ^{13}C acetate を用いた胃排出能検査の標準法が提案されている。

【目的】液体食と ^{13}C acetate を用いた胃排出能検査における T max と T 1/2 による判定結果の差違を明らかにする。

【対象】消化器症状を有しない健常人52人と胃排出遅延が疑われる dysmotility like FD 5人, DM 14人の計71人。

【方法】標準法に従い、液体試験食(ラコール 200 kcal/200 ml)と ^{13}C acetate (100 mg) を用いた胃排出能検査を施行。同一症例において判定指標を T max とした場合と T 1/2 とした場合で判定結果を比較した。

【結果】T max, T 1/2 ともに遅延と判定されたのが13例、ともに正常が56例、T 1/2 のみ遅延が1例、T max のみ遅延が1例であった。判定結果の乖離は全71例中2例で、T max, T 1/2 の判定結果の一致率は97.2%であった。

【結語】標準法による ^{13}C 胃排出能検査において T max, T 1/2 による判定結果はほぼ一致し、安定した検査法であることが示唆された。

S2-7. ^{13}C -酢酸呼気試験による胃排出能検査の有用性

日本医科大学付属多摩永山病院・内視鏡科

松久 威史

【目的】 *Helicobacter pylori* 感染，除菌診断に ^{13}C -尿素呼気試験が用いられるようになり，機能検査を含めた種々の呼気テストの有用性が検討されている。 ^{13}C -酢酸呼気試験により胃疾患，糖尿病患者の胃排出能の特徴を観察した。また，アセトアミノフェン (APAP) 法を同時に行い， ^{13}C -酢酸呼気試験との相関についても検討した。【対象と方法】 対象は ^{13}C -酢酸呼気試験，APAP 法を行った 57 症例である。昨年日本平滑筋学会（ワークショップ）において検討された ^{13}C -呼気試験の標準化案を参考に胃排出能検査を行った。胃排出能の測定には液常試験食 (OKUNOS-A: 200 ml) に ^{13}C -酢酸 (100 mg)，APAP (20 mg/kg) を混和したものを使用した。呼気の採取は試験食摂取前，摂取 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 165, 180 分後に行い， $^{13}\text{CO}_2$ の測定は質量分析法で行った。その際，呼気中 CO_2 存在率が最高値となる時間すなわち Tmax を胃排出能の評価指標とした。 $^{13}\text{CO}_2$ 濃度 (‰) は質量分析法により測定した。APAP 法による胃排出能は試験食摂取 45 分後の血中 APAP 濃度で判定した。【成績】 前庭部が短縮し高度変形を伴う胃潰瘍 (N=4) の Tmax 平均値は 105 分と著明に延長しており，APAP 値も $2.4 \mu\text{g/ml}$ と低値を示した (健常人の Tmax は 45 分，APAP 値は $10.4 \mu\text{g/ml}$)。NUD (N=4)，糖尿病患者 (N=4) の Tmax，APAP 値も延長，低下傾向にあった (NUD の Tmax: 75 分，APAP: $8.7 \mu\text{g/ml}$ ，糖尿病の Tmax: 90 分，APAP: $6.9 \mu\text{g/ml}$)。一方， ^{13}C -酢酸呼気試験の 15, 30, 45 分値と APAP 値には正の相関が認められた (N=57) (15 分: 相関係数 0.502, 30 分: 相関係数 0.477, 45 分: 相関係数 0.477, いずれも $P < 0.001$)。【結論】 ^{13}C -酢酸呼気試験は胃疾患のみならず胃運動能に影響を及ぼす疾患の胃排出能検査に有用であることが示された。

1. 炎症時の消化管運動機能障害における筋層在住マクロファージの役割：クローン病モデル動物での検討

東京大学・農・獣医薬理学

尾崎 博, 堀 正敏, 唐木 英明

消化管運動の主体をなす平滑筋の収縮活動は、カハール介在細胞 (Interstitial cell of Cajal, ICC) や神経による調節を受けている。これらに加えて、最近、免疫系の細胞が消化管運動系に影響を与えることが示唆されてきている。そうした細胞の候補の一つが、消化管筋層内、特に筋層間神経叢と ICC と同一平面上に規則的に分布するマクロファージ (腸筋層内存在マクロファージ) である。本研究では、炎症性腸疾患にみられる腸管運動機能障害の機序を明らかにするため、クローン病のモデルとされる 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 誘発性腸炎ラットを用い、ICC および神経機能と存在マクロファージとの関係について検討した。

結果：手術により結腸の特定部位に TNBS を注入し、その後 7 日間放置しておく、粘膜の糜爛を主徴とする明らかな腸炎が観察された。この様な結腸標本では、筋層間に存在する存在マクロファージの数が 2~3 倍に増加していた。一方、TNBS 処置したラットから摘出した結腸標本では、対照と比べて c-kit 陽性の ICC 細胞ネットワークが明らかに乱れていた。また、これと対応して、自発性収縮も TNBS 処置標本で減弱していた。また、TNBS 処置により消化管壁の神経機能が減弱することがすでに知られているが、これと対応して PGP9.5 陽性の神経ネットワークの破壊も観察された。電子顕微鏡により、ICC、神経、マクロファージの位置関係を観察すると、これら 3 つの細胞が筋層間に互いに近接して観察された。腸炎病態時に増加したマクロファージは、特に神経組織と近接して存在していた。

考察：以上の成績から、TNBS 腸炎の消化管平滑筋の運動機能の減弱に、ICC ならびに神経ネットワークの破壊が関与することが明らかとなった。これらネットワークの破壊に、筋層内存在マクロファージが関与している可能性が示唆された。

2. 肛門側近側結腸運動の壁内神経性調節

岡山学院大学・人間生活・食物栄養学科・解剖生理学

山里 晃弘

マウス (20 匹, ♂) を撲殺した後、近側結腸を回盲活約部からペースメーカー部位までを摘出し、混合ガスで通気した Tyrode 液中でペースメーカー部位より口側 1 cm (ペースメーカー部位と思われる結腸中央部の緊張度の高い部位は除去) の標本を摘出し、マグヌス法を用いて運動を記録した。フィールド電気刺激は 0.5 msec, 10~20 Hz, 5~10 V を用い、この刺激効果に対する自律神経遮断薬の効果を検討した。

肛門側近側結腸の自発運動の収縮頻数は平均 4.3 回/分であった。この自発運動は C_0 および atropine と guanethidine の投与により 2.5 回/分に間で減少したが、L-NAME の投与により 4.7 回/分にまで増加した。電気刺激により誘起された抑制効果および亢進効果は C_0 の投与により減弱あるいは消失したが、guanethidine の投与後には亢進効果は消失しなかった。atropine 投与においてはこの亢進効果は抑制効果に転じる場合と、抑制効果に引き続いて亢進効果が現われる例があった。Atropine と guanethidine の同時投与後に電気刺激によって誘起される抑制効果は L-NAME によって消失したが、L-arginine の投与により回復した。これらの結果から口側近側結腸では cholinergic および adrenergic neuron が亢進的に作用していたが、肛門側近側結腸では亢進効果は cholinergic neuron によって誘起され、抑制効果の一部は adrenergic neuron によって誘起されていると考えられる。また guanethidine 投与後に残存する抑制効果は NO によって誘起されていると考えられる。

3. W/W^v 変異マウス小腸の自発的電気活動と収縮

奈良県立医科大学・第一外科学¹, 同・第二生理学²

中川 正¹, 山内 昌哉¹, 上島 成幸², 藤井 久男¹, 中島 祥介¹, 高木 都²

我々はカハールの介在細胞のサブクラス (ICC-MY) が欠損するとされる W/W^v 変異マウスの小腸を用いてその電気活動と輪走筋・縦走筋の収縮を同時記録し, 腸管自発運動に対するカハールの介在細胞と腸壁内神経系の関わりを検討した. 1 cm 長の摘出腸管に対し長軸方向の等尺性張力の変化を縦走筋収縮, 腸管腔内圧の変化を輪走筋収縮としてトランスデューサを介して記録した. 同時に漿膜面に吸引電極を装着し, 細胞外誘導による電気活動を記録した. 対照とした+/+マウスでは縦走筋・輪走筋の規則的な運動が同期して記録され, これに対応して slow wave と spike potential が記録された. これらの運動, 電気活動は Tetrodotoxin あるいは L-NAME の投与に影響されなかった. W/W^v 変異マウスでは slow wave は記録されなかったが, 活動電位を伴う不規則な運動が記録された. 回腸において運動の間隔を計測すると, Tetrodotoxin あるいは L-NAME の投与により各々投与前 3.85 ± 1.88 秒, 2.92 ± 0.29 秒から投与後 1.97 ± 0.36 秒, 2.06 ± 0.23 秒と有意に短縮することがわかった. 同様に変動係数 (coefficient of variance; SD/mean) も各々投与前 2.17 ± 1.15 , 2.17 ± 1.16 から投与後 0.30 ± 0.16 , 0.30 ± 0.07 と有意に小さくなり規則性が増すことがわかった. +/+マウスではこのような変化は見られなかった. これらの結果から, 腸管運動は ICC-MY が欠損下ではその存在下よりも腸壁内神経系による抑制が強くなっていることが示唆された. さらにこの示唆を裏づけるために c-Kit と PGP9.5 を標的として ICC と腸壁内神経を免疫染色して+/+マウスと W/W^v 変異マウスとを比較検討した結果を報告したい.

4. マウス近位側結腸自動運動におけるペースメーカー機構

奈良県立医科大学・第二生理学

高木 都, 米田 諭, 門脇 真

マウス近位側結腸では, 2種類の自発運動が記録される. 低振幅で早いリズムの運動 (平均 15.6 ± 2.7 回/分) が輪走筋方向のみで記録され, 高振幅で遅いリズムの運動 (平均 3.9 ± 1.5 回/分) が, 輪走筋と縦走筋の両方向で記録された. この前者の運動は粘膜下層をはぎ取って粘膜下層と輪走筋層の間にあるカハールの間質細胞のネットワーク (ICC-SM) を取り除くと消失する. しかし, 後者の運動は変わらず輪走筋と縦走筋の両方向で記録された. この ICC-SM の膜電位を記録すると特徴的なプラトー電位が得られた. このプラトー電位は平均 15.9 回/分 (13-20 回/分) の頻度で発生し, 輪走筋方向の低振幅で早いリズムの運動と同期していた. このプラトー電位はテトロドトキシンやアトロピンで影響を受けなかった. 一方, 輪走筋細胞からは活動電位のバースト (頻数: 3.9 ± 1.5 回/分) が記録され, 縦走筋細胞からは振動電位のバースト (頻数: 3.4 ± 1.0 回/分) が記録された. これらの電位は高振幅で遅いリズムの運動と同期しており, 頻数も一致した. しかし, プラトー電位の発生頻数とは明らかに異なっていた. また, これらの電位や高振幅で遅いリズムの運動はテトロドトキシンにより頻数が増加したが, アトロピンでは影響を受けなかった. NO 合成阻害薬, L-NAME $10 \mu\text{M}$ は頻数を増加させた. 細胞内の Ca^{2+} ハンドリングを阻害するとプラトー電位の発生は抑制されたが, 輪走筋細胞からの活動電位のバーストや縦走筋細胞からの振動電位のバーストは消失しなかった. 以上の結果から, マウス近位側結腸自動運動においては 2つのペースメーカー機構が存在し, 1つは, ICC-SM でプラトー電位を発生し, 低振幅で早いリズムの運動を駆動し, もう一つのペースメーカー細胞 (おそらく ICC-MY) は輪走筋細胞の活動電位のバーストや縦走筋細胞の振動電位のバーストを発生させ, 高振幅で遅いリズムの運動を起こすことが判った.

5. 胚性幹細胞から分化誘導した腸管様細胞塊の自動運動の発生機序

奈良県立医科大学・第二生理学¹, 名古屋大学・医・第二外科学², 同・医・第二生理学³
早稲田大学・人間科学・人間基礎科学科⁴

高木 都¹, 石川 忠雄^{1,2}, 中山 晋介³, 堀口 和秀⁴, 三澤 裕美¹, 中川 正¹
中尾 昭公², 小室 輝昌⁴

胚性幹細胞培養系を用いて胚性幹細胞から腸管様の細胞塊を作製し、この腸管様の細胞塊 (ES 腸管様細胞塊) の基本的な生理学的性質を検討した。方法: 自動運動のビデオ記録と電気的活動の記録を行った。さらに、主に自発運動を有する ES 腸管様細胞塊のカルシウムオッシレーションを、fluo-3 を指示薬として用いて測定した。結果: ES 腸管様細胞塊はドーム状、管状やシート状の様々な形態を示し、様々なタイプの自動運動を示す。すなわち、規則的な周期性を持った蠕動運動様や局所的な振子運動様の自発運動など様々であった。これらの自動運動の発生頻数に対し、L 型 Ca^{2+} チャネル、 Cl^- チャネル、リアノジン受容体および IP_3 受容体のブロッカーは減少効果を示した。一方テトロドトキシンは顕著な効果はなかった。このような ES 腸管様細胞塊に c-Kit 陽性でカハールの間質細胞様の細胞が分化していることを共焦点顕微鏡と電子顕微鏡で確認した。カハールの間質細胞様の細胞が分化している ES 腸管様細胞塊で様々な頻度の広い範囲にわたるカルシウムオッシレーションが観察された。少数例であるがマウス胃のカハールの間質細胞のプラトー電位様の膜電位変化を記録することができた。また平滑筋細胞から slow wave の記録ができた。振幅は 5~20 mV で、頻数は 5~20 回/分であった。結論: 以上の結果から、胚性幹細胞から分化誘導してできた腸管様細胞塊には c-Kit 陽性でカハールの間質細胞様の細胞が分化しており、ペースメーカー (プラトー) 電位を発生させ、それが平滑筋層に伝播し、slow wave を発生させ、細胞塊にカルシウムオッシレーションを起こし、自動運動を起こすと考えられる。この自動運動に神経はそれほど関与せず、チャネル、受容体については細胞塊の分化度により異なり、その関与は一様でないと思われる。

6. 手術摘出ヒト大腸平滑筋の薬理的な反応性を指標とした凍結保存方法の検討

獨協医科大学・薬理¹, 同・第一外科², 国立医薬品食品衛生研究所薬理部³

上川雄一郎¹, 渋川 朝子¹, 内田 幸介¹, 佐々木欣郎², 砂川 正勝², 大野 泰雄³

【目的】我々は前回、外科手術で摘出されたヒト消化管平滑筋を薬理試験に利用する際の適切な冷蔵保存方法について検討し、リン酸緩衝液に浸して 4°C 冷蔵保存すれば、3 日間は収縮、弛緩反応が再現できることを報告した (第 43 回日本平滑筋学会総会)。今回の研究目的は、ヒト大腸平滑筋を凍結保存するために適切な保存液を開発することである。

【方法】文書による同意の得られた大腸癌患者 19 名 (男性 14 名, 女性 5 名, 平均年齢 65.5 ± 2.5 歳) から外科的に切除された遠位結腸より肉眼的に癌細胞浸潤のない輪状平滑筋部分を幅約 3-4 mm, 長さ約 12-13 mm の大ききで切り出し、1.8 ml 凍結保存液の入った凍結用チューブに浸して 24 時間かけて 80°C に凍結させ、1 ヶ月以上保存した。一部の凍結保存液には、牛胎児血清や凍結氷害防止剤として 10-20% ジメチルスルフォキシド (DMSO) を加えておいた。摘出当日の新鮮標本と、一ヶ月以上凍結保存後解凍した標本を 37°C Krebs 栄養液で満たした 10 ml オルガンバスに 1 g の負荷をかけて懸垂し、その輪状平滑筋のカルバコール収縮と高 K 収縮を検討した。

【結果】新鮮標本でのカルバコール収縮の pEC_{50} や Emax と比較して、1 ヶ月以上凍結保存後に解凍した標本ではこれらの数値が低い傾向にあったが、保存液による相違が大きく、無血清培地に DMSO を加えた水製薬の凍結保存液 SFM101 で保存した場合に最も良好な収縮反応が再現された。なお、凍害防止剤として DMSO を加えない保存液や血清を添加した保存液では、収縮反応は極端に減弱していた。

【結論】外科手術で摘出されたヒト大腸標本を薬理試験に使用するために凍結保存するには、適切な保存液を選択すれば可能であることが明らかになった。本研究は平成 13~15 年度ヒューマンサイエンス振興財団の援助を受けた (課題番号 KH71067)

7. 意識下の犬に対する迷走神経電気刺激が胃運動機能に及ぼす効果

東北大学・医・先進外科学

更科 広記, 黒川 良望, 上野 達之, 安齋 実, 二瓶 義博, 里見 進

【背景】今までに、麻酔中の動物に迷走神経電気刺激を行うと胃底部の弛緩及び前庭部の収縮が起こることが報告されている。また近年、治療抵抗性のもんかん部分発作や難治性うつ病に対して、(意識下)迷走神経電気刺激が臨床応用され始めた。しかし、今まで人はもちろん動物でも意識下に迷走神経電気刺激が胃運動機能に及ぼす効果を調べた研究はほとんど無い。

【方法】ビーグル犬(♀, n=6)に対して、刺激用として迷走神経前枝(腹部食道の位置)に双極電極を装着し、測定用として胃幽門部に strain gauge transducer を、胃体部から幽門部の大弯側に gastric myoelectrical activity (GMA) 測定電極を4個装着した。実験は、術後2週間以上おいてから行った。

【結果】迷走神経電気刺激により胃前庭部の収縮はコントロールに比べて有意に増大し、GMAも有意差は無いものの改善傾向を認めた。

【まとめ】意識下の犬に対して迷走神経電気刺激を行うことにより、胃運動機能は亢進することがわかった。今回は腹部迷走神経を電気刺激したが、頸部迷走神経を刺激した場合についても現在実験中である。さらに emptying についても現在実験中である。

8. 意識下ラットの小腸運動に対する経静脈 ghrelin 投与の影響

群馬大学・医・臓器病態制御・小児生体防御学¹, 同・病態総合外科学²

宮沢 麗子¹, 石毛 崇¹, 友政 剛¹, 金子 浩章¹, 森川 昭廣¹, 高橋 篤²

【背景】ghrelin (Ghr) はラットの胃から分離された28個のアミノ酸からなるペプチドで、成長ホルモン放出因子受容体(GHSR)を介して成長ホルモン(GH)分泌を刺激するが、その他にも食欲増進などの生理作用を有している。また消化管への作用として、胃酸分泌促進および胃運動亢進作用が知られている。

【目的】ラットの腸運動に対するGhrの作用を、壁外に縫着したforce transducerで収縮圧を記録することにより検討する。

【方法】Wistar系雄性ラット、体重300-400gを対象とした。pentobarbital(35mg/kg; i.p.)麻酔下で、Treiz靱帯から5cm肛門側の空腸漿膜側にforce transducer(FT04-SS, スターメディカル)を縫着し、術後5日以上回復期の後、得られる信号を増幅器を通じてコンピューターに入力した。空腹時(30~36時間飢餓後)の小腸運動を3時間以上記録し、最後のphase3終了4min後に尾静脈からGhr(10, 25, 50 μg/kg; i.v.)またはcontrol(0.9% NaCl; i.v.)を投与した。データ解析には専用ソフトウェア(8 Star, スターメディカル)を用いた。

【結果】① Ghr 0, 10, 25, 50 μg/kg 投与後にそれぞれ1/8匹, 4/6匹, 5/5匹, 6/6匹に1~2分間持続する収縮波群が出現した。② Ghr 投与から収縮波出現までの時間は、10, 25, 50 μg/kgそれぞれ、57±22秒, 25±28秒, 27±16秒であった。③ 収縮波群の持続時間はそれぞれ、1分59秒±1分23秒, 1分20秒±7秒, 1分32秒±31秒であった。④ 収縮波のmean amplitudeは、Ghr投与前のphase3のamplitudeを100とした場合それぞれ、38.0±15.3%, 42.6±5.8%, 48.1±19.0%であった。⑤ phase3から次のphase3までのintervalは、Ghr投与前が9分22秒±4分58秒であり、Ghr投与後はそれぞれ13分46秒±4分46秒, 17分17秒±9分43秒, 12分46秒±1分47秒であった。

【まとめ】意識下ラットにおいて、経静脈的Ghr投与は小腸に収縮運動を惹起した。

9. ビーグル犬を用いた結腸運動に対する生理学的検討（第1報）

国立栃木病院・小児外科¹, 慶応義塾大学・医・外科², 中外製薬株式会社富士御殿場研究所³
聖路加国際病院・小児外科⁴

平林 健^{1,2}, 森川 康英², 星野 健², 尾崎 賢一³, 松藤 凡⁴, 渡邊 稔彦²
下島 直樹², 亀井 研志³, 北島 政樹²

今回、我々は、排便時の結腸運動の解析を目的として、ビーグル犬を用いて生理学的に考察した。

(方法) ① フォーストレインゲージ(SG)を、上行結腸(SG1), 横行結腸(SG2), 下行結腸(SG3), S状結腸(SG4), 直腸(SG5)に横軸方向に縫着した。術後3週間後より腸管運動を、テレメトリーシステムを用いて無拘束下に観察した。併せて、暗視カメラ及びハードディスクビデオレコーダーを用い、犬の行動を記録した。② ビーグル犬1例に対して、給餌1時間後に、エリスロマイシン誘導体であるGM-611(10~30 mg/頭)を投与し、投与後の腸管運動、及び排便状況を観察した。(結果) ① 暗視カメラで排便行動を観察することは可能であり、排便間隔は、平均8時間であった。排便前約10分間、床の臭いを嗅ぎ回る様な行動を行い、同時に結腸運動が活性化した。その後、定位置で腰をかかめ便を排泄した。排便開始時に、巨大収縮運動が横行結腸に生じ、下行結腸・S状結腸・直腸が大きく弛緩した。巨大収縮運動が直腸に伝播し、便が排泄され、排便が終了した。結腸運動の活性化は平均30分間持続した。② GM-611(30 mg/頭)投与時は、投与1~3時間後から約1時間30分間の結腸運動の活性化を認め、その間に1~2回の排便が観察された。排便後2~5時間、Colonic Motor Complex(振幅30g, 持続5分間以上)は抑制された。その後、平均20時間後に次の排便が観察された。(考察) 暗視カメラとテレメトリーシステムを組み合わせることにより、犬の排便時の行動および結腸運動が観察可能であった。排便前の犬の行動と結腸運動の活性化は便意を反映していると推測された。排便時の結腸運動は、横行結腸からの巨大収縮運動の肛側への伝播と下行結腸・S状結腸・直腸の弛緩運動の運動が重要と考えられた。また、今回構築したシステムを用いることで、犬におけるGM-611の排便及び結腸運動に対する作用の検討が可能であると考えられた。

10. 塩酸ドキサプラム（ドプラム®）のラット消化管収縮運動に与える影響

群馬大学・医・臓器病態制御・小児生体防御学¹, 同・病態総合外科学²

石毛 崇¹, 宮沢 麗子¹, 友政 剛¹, 金子 浩章¹, 森川 昭廣¹, 高橋 篤²

【背景】未熟児の無呼吸発作に対して投与されるドキサプラムの副作用として、壊死性腸炎が報告されている。ところで、ヒトの未熟児にみられる壊死性腸炎の病因の一つとして、小腸の運動異常、特にMMCパターンの欠如が挙げられている。そこで、ドキサプラムが引き起こす壊死性腸炎の病態に消化管運動異常が関与する可能性が推定される。

【目的】意識下ラットにおいて、消化管収縮運動に対するドキサプラムの影響を検討する。

【方法】Wistar系雄性ラット、体重300-400gを対象とし、幽門部前壁またはTreitz靭帯より5cm 肛門側の空腸漿膜面に小型フォーストランスデューサー(FT04-SS, スターメデイカル)を縫着し、5-7日の回復期間の後、トランスデューサーを増幅器を通じてコンピューターに接続、記録・解析用ソフトウェア(8 Star, スターメデイカル)を用いて空腹時(30~36時間飢餓後)の消化管収縮運動を記録した。尾静脈よりドキサプラム20 mg/kg/hを1時間持続静注し、投与前後で収縮運動を比較した。

【結果】ドキサプラム20 mg/kg/hrの投与は、① 幽門の収縮数、収縮波高、motility index (MI)を有意に増加させた。投与前、投与後1, 2, 3時間のMIはそれぞれ1, 3.19±2.07, 3.64±2.73, 4.81±4.86であった。② 小腸でも投与後に収縮数の増加を認め、一部では、phase 3が消失した。

【結語】意識下ラットにおいて、ドキサプラム20 mg/kg/hrの投与は幽門および小腸の収縮運動を変化させた。ヒト未熟児にみられるドキサプラム投与中の壊死性腸炎の病態に消化管の運動異常が関与する可能性がある。

11. 胃排出能に関与する幽門括約筋の収縮・弛緩反応

昭和大学保健医療学部・生理¹, 同・薬・薬理², 中山医科大学・薬理³

坂井 泰¹, 朱 邦豪^{1,3}, 野部 浩司², 百瀬 和亨²

「緒言」胃腸管運動における神経支配には非アドレナリン作動性、非コリン性 (NANC) 神経支配が重要な役割を演じていることが知られているが、胃排出能とそれに関わる神経伝達物質については未だ明らかでない。

今回、胃排出能と NO の関係を明らかにする目的で、ラット胃幽門洞部、幽門部括約筋、十二指腸の収縮・弛緩反応に着目し検討した。「実験方法」雄性 Wistar rat を脱血死後、室温下にて混合ガス (95%O₂, 5%CO₂) を通気した Krebs-Henseleit 緩衝液 (KHB) 中に幽門洞部・幽門括約筋・十二指腸を摘出した。室温で各部位の輪走筋方向の筋条片を作製し、混合ガスを通気した 37°C の KHB オーガンバス中に懸垂し、フォーストランスジューサーを介し収縮・弛緩反応を等尺性に記録した。また、NADPH diaphorase を酵素組織化学的に染色し、NO 合成酵素の分布について検討した。「結果」括約筋、幽門洞部、十二指腸の神経刺激 (0.5 msec duration, 50 V, 20 Hz) に対する反応は、括約筋では刺激時弛緩反応が観察されたが、幽門洞部および十二指腸では収縮・弛緩反応は観察されなかった。また、20 mM KCl に対する反応は括約筋では弛緩反応が観察され、幽門洞部では収縮反応が、さらに十二指腸では弛緩反応から収縮に転じる傾向が観察された。括約筋および幽門洞部の KCl に対する濃度依存性収縮・弛緩反応は、括約筋では低濃度では弛緩反応を示すが、高濃度においては収縮反応を示した。一方、幽門洞部では低濃度においては律動性収縮が促進され、高濃度では緊張性収縮が促進された。LMNA を作用させると括約筋では収縮反応が出現したが、幽門洞部では変化しなかった。LMNA 処理 10 分後の KCl に対する反応は低濃度における弛緩反応の一部は阻害され、収縮増強が観察された。KCl の弛緩反応は TTX で完全に阻害された。また、括約筋に NADPH diaphorase 陽性細胞が認められた。「考察」LMNA で収縮が惹起され L-arginine により弛緩すること、また、低濃度 KCl により弛緩し、この弛緩反応は LMNA で阻害され、TTX 存在下で完全に阻害されることから胃排出能に括約筋の NO 神経の関与が推察された。

12. モルモット摘出腸管に対する芍薬甘草湯 (TJ-68) の作用

千葉大学・医・腫瘍内科学

相 正人, 山口 武人, 尾高 健夫, 三橋 佳苗, 穴戸 忠幸, 税所 宏光

【目的】モルモット摘出大腸平滑筋における TJ-68 の作用を明らかにする。【方法】Krebs solution (37°C, 95%O₂-5%CO₂ ガス通気) を用い、0.5 g 負荷で近位、遠位大腸の輪走筋、縦走筋の反応を等張性にて測定した。実験項目として 1) 静止緊張性に対する作用、2) 非コリン性非アドレナリン性 (NANC) 反応に対する作用、3) 等張性高 KCl 収縮に対する作用を観察した。各実験で hyoscine も累積投与し同様に測定した。1) では各濃度の反応は ACh (縦走筋: 10⁻⁵ mol/l, 輪走筋: 10⁻⁴ mol/l) の収縮高に対する割合で表した。2) の電気刺激実験は atropine (10⁻⁶ M), guanethidine (3×10⁻⁶ M) 存在下で、刺激条件は 0.5 ms duration, 250 mA, 10 Hz, 30s で行った。結果は被検薬投与前の刺激反応に対する投与後の反応を百分率 (%) で表し、溶媒投与群を control とし比較した。3) は通常の Krebs solution の NaCl を KCl に置換調整し、遠位大腸縦走筋で行った。被検薬各濃度の反応は被検薬投与前の収縮高を 100% として算出した。【結果】実験 1): TJ-68 は近位大腸縦走筋、輪走筋をともに約 20% 収縮させる一方、遠位大腸では 10⁻³ g/ml で縦走筋を 70%、輪走筋を 10% 弛緩させた。hyoscine は近位大腸では 3×10⁻⁸ g/ml で縦走筋を 25% 収縮させたが、3×10⁻⁵ g/ml では縦走筋を 15%、輪走筋を 27% 弛緩させた。遠位大腸では 3×10⁻⁵ g/ml で縦走筋を 103%、輪走筋を 70% 弛緩させた。実験 2): TJ-68 は 10⁻³ g/ml で近位大腸縦走筋の収縮反応を有意に 30% 抑制した。hyoscine は遠位大腸縦走筋の収縮反応を 10⁻⁷ mol/l で有意に 120% 増強した。実験 3): TJ-68 は 10⁻³ g/ml で収縮反応を 50% 抑制したが、hyoscine では作用は認められなかった。【結論】hyoscine は主に神経性の抑制作用を有し、TJ-68 は非選択的抑制作用を有すると考えられた。

13. 健常者，逆流性食道炎患者の一過性 LES 弛緩の違い

日本医科大学・第3内科

岩切 勝彦，林 良紀，田中由理子，琴寄 誠，杉浦 敏昭，川上 明彦
坂本 長逸

背景：逆流性食道炎（RE）は過度な胃食道逆流（GER）の存在により発生する。GERの主なメカニズムは一過性LES弛緩（TLESR）はであるが、健常者（HS）とRE患者間のTLESRの発生頻度には差がないとする報告が多く、両群の違いはTLESR時のGERの合併率の違いであるとされている。TLESR時のLES弛緩時間の違いがGER合併率に影響する可能性は考えられる。今回、両群のTLESRの持続時間を含めた違い、TLESRの特徴を明らかにする。方法：RE患者（LA分類，grade C）5例と比較検討可能なHS5例に対し食前1時間，後3時間の食道内圧，pH測定中にみられた188回のTLESR（LES弛緩開始前4秒，開始後2秒に嚥下がなく，LES弛緩残圧2mmHg未満，LES弛緩時間が10秒以上）を検討した。食道内圧検査は21チャンネルのサイドホールを有するカテーテルを使用しinfused catheter法により測定した。カテーテルは遠位より1cm間隔で9個のサイドホールがあり，その口側に2-3cmの間隔で計21個のサイドホールを有し，1cm間隔のサイドホール内にLESを設置し，LESの評価を行った。pHカテーテルはLES口側5cmに設置しGERを評価した。結果：TLESRの発生頻度は両群に違いは見られなかった。TLESR時のGERの合併率は，RE群がHS群に比べ有意に高率であった。TLESRの弛緩時間は両群に違いは見られなかった。TLESRの特徴は，嚥下によるLES弛緩と異なりTLESR開始とともに横隔膜運動が抑制される，多くのTLESRのLES弛緩終了時に通常より明らかに強いLESの収縮が見られる，また一部のTLESR開始直前に下部食道に同時性収縮が見られることであった。これらの特徴は両群とも同様であった。結論：RE群のTLESR時のGER合併率は，HS群に比し有意に高率であったが，TLESR弛緩時間に違いは見られなかった。

14. 新規二型糖尿病モデルマウスにおける摘出胸部大動脈に対する弛緩反応の検討

星薬科大学・医薬研・機能形態

田口久美子，小林 恒雄，松本 貴之，鎌田 勝雄

【目的】糖尿病は1型糖尿病と2型糖尿病に大別され，日本人では2型糖尿病が約95%と圧倒的に多く，今後益々増加する傾向である。糖尿病性合併症に共通した病理学的特徴は血管障害（大血管障害と細小血管障害）であり，血管障害は内皮細胞の機能低下が原因であると言っても過言ではない。そこで，今回，streptozotocin (STZ) と nicotinamide を組み合わせて2型糖尿病マウスを作成し，STZ誘発1型糖尿病マウスと血管障害について比較・検討した。日本人の2型糖尿病はインスリン分泌不足が原因の場合が多く，本糖尿病モデルは日本人の糖尿病モデルに近いという可能性も模索してみた。【方法】STZとnicotinamide投与12週間後の動物及び対照動物から胸部大動脈を摘出し，幅約2mmのリング標本を作製して弛緩反応を測定した。【結果・考察】Sodium nitroprusside (SNP) による弛緩反応に変化がなかったことから，血管平滑筋の弛緩機構には変化は見られないと考えられる。clonidine (α_2 -agonist) でSTZ群・STZ+Nic群共に弛緩が抑制されたことから，糖尿病では α_2 受容体の感受性が著明に減少すると考えられる。また，isoproterenol (β -agonist) ではcontrol群に対しSTZ+Nic群で有意に弛緩が減弱し，STZ+Nic群に対しSTZ群で有意に弛緩が減弱したことから， β 受容体の系も変化が起きていることが示唆される。これらの点については今後，受容体の遺伝子発現について検討する予定である。また，L-NOARG (NO synthase inhibitor) を前処置するとisoproterenolによる弛緩反応が85%ほど抑えられることから，マウスの胸部大動脈ではほとんどの β_2 受容体は内皮細胞にあり，弛緩反応がNOにより起こることが示唆される。従来，isoproterenolによる弛緩反応は一部に内皮細胞を介する反応があるものの，約70%は血管平滑筋上の β_2 受容体を介して生じると報告されているが，マウスの胸部大動脈では約85%弛緩反応が内皮細胞依存性であることが明らかとなったが，これは新しい発見であり，今後詳細に検討する予定である。

15. 糖尿病ラット腸管膜動脈における EDHF 様弛緩反応に対する cAMP の関与

星薬科大学・医薬研・機能形態

若林賢太郎, 松本 貴之, 小林 恒雄, 鎌田 勝雄

【目的】血管内皮由来過極因子 (Endothelium-derived hyperpolarizing factor; EDHF) は, 細小血管において主要な弛緩因子である。糖尿病時においては内皮依存性弛緩反応が減弱することが数多く報告されているが, その詳細な機序については未だ解明されていない。最近, EDHF-type relaxation は, cAMP によって modulate されることが報告されている。そこで今回我々は, streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットにおける EDHF-type relaxation に対する cAMP の役割について検討した。【方法】STZ 投与後, 10 週間後の動物及び対照動物から上腸管膜動脈を摘出し, 長さ 2 mm のリング標本を作製して収縮・弛緩反応を測定した。EDHF-type relaxation を測定するため, L-NOARG (NOS inhibitor; 100 micro M), Indomethacin (COX inhibitor; 10 micro M) を前処置した。また, cAMP 系の関与について検討するために, phosphodiesterase (PDE) inhibitor を L-NOARG, Indomethacin と共に処置した。また, PDE の遺伝子/蛋白発現については RT-PCR/ immunoblotting 法を用いて検討した。組織中の cAMP content については EIA により解析した。【結果】対照動物と比較して, STZ 群における EDHF-type relaxation は著明に減弱していた。PDE inhibitor 前処置下における EDHF 弛緩反応は, 対照群, STZ 群いずれにおいても増強し, さらに STZ 群の弛緩増強反応は対照群と同程度であった。RT-PCR/ immunoblotting 法により遺伝子/蛋白発現の変化を検討したところ, PDE3 の発現が, STZ 群において著明に増加した。【考察】EDHF-type relaxation は, IBMX 前処置により著明に増加することより, cAMP が EDHF の作用を強めていることが明らかになった。糖尿病ラットにおいて, EDHF-type relaxation が著明に減弱し, また IBMX 処置により対照群と同程度にまで増強すること, 更には糖尿病時には PDE の発現が増大することから, 糖尿病時にはこの cAMP 作用が減弱しているのではないかと考えられる。

16. 過酸化水素がモルモット大動脈平滑筋スキンド標本収縮に与える影響

東京医科大学・内科学第二¹, 同・生理学第一²

櫻井 渉¹, 渡辺 賢², 山科 章¹, 小西 真人²

活性酸素の一種, 過酸化水素 (H_2O_2) は大動脈生筋標本の収縮反応を増強することが知られている (Zhi-wei Yang ら 1997 年) が, そのメカニズムは未だ不明である。

われわれは, H_2O_2 の収縮タンパク質系への直接効果の有無を検討するために, モルモット大動脈の細胞膜を β -escin 処理によって破壊したスキンド標本収縮に対する H_2O_2 の効果を検討した。

100 μ M 以上の H_2O_2 は収縮の Ca^{2+} 感受性に影響与えることなく Ca^{2+} 依存性収縮を増強した。また 30 mM Mg^{2+} による Ca^{2+} ・ミオシン軽鎖リン酸化非依存性の張力保持に対しても H_2O_2 は増強作用を示した。 H_2O_2 分解酵素であるカタラーゼは H_2O_2 による収縮増強効果を消失させたので, 代謝産物ではなく H_2O_2 自体が直接アクチンミオシン相互作用に影響して収縮を増強したと考えられる。

17. イヌ脳底動脈における伸展刺激によるミオシン軽鎖の3リン酸化とミオシン ATPase の抑制

静岡県立大学・薬・薬理

小原 一男, 見立 絢子, 松永 祐実, 中山 貢一

【目的】我々はこれまでイヌ脳底動脈において緩徐伸展刺激によりミオシン軽鎖(MLC)の Ser/Thr 残基 3ヶ所がリン酸化されることを報告してきた。一方、アクトミオシン MgATPase 活性(ミオシン ATPase 活性)は MLC のリン酸化により調節されていることが知られている。そこで本研究では伸展誘発性 MLC の 3リン酸化のミオシン ATPase 活性におよぼす影響について検討した。

【方法】雌雄雑種成犬(体重 10-18 kg)から摘出した脳底動脈より作製したリング標本に機械刺激装置を用いて 1 mm/sec の速度で初期筋長の 1.5 倍の伸展刺激を 15 分間加えた。MLC のリン酸化は等電点電気泳動法/イムノプロット法により測定された。ミオシン ATPase 活性の指標として伸展前後のリング標本より作成したスキンド標本中の Ca^{2+} 添加による NADH の蛍光変化を測定した。リン酸化部位の同定にはトリプシン処理による 2次元ペプチドマップを作成した。

【結果】イヌ脳底動脈において、伸展刺激により MLC の 3ヶ所がリン酸化された。また、伸展後の標本におけるミオシン ATPase 活性は伸展前のそれと比較し低下した。伸展刺激による MLC の 3リン酸化とミオシン ATPase 活性の低下はプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害薬カルホスチン C や Rho キナーゼ阻害薬 Y-27632 により抑制された。一方、ペプチドマップの検討から伸展刺激による MLC のリン酸化部位は Ser-19, Thr-18 および Thr-9 の 3ヶ所であった。カルホスチン C によりリン酸化 Thr-9 が、また、Y-27632 によりリン酸化 Thr-9 および Thr-18 が消失した。

【考察】イヌ脳底動脈において伸展刺激によるミオシン ATPase 活性の低下に Rho/Rho キナーゼ系が関与すること、また、PKC による Thr-9 のリン酸化が重要であることが示唆された。

18. ヒト血管機能に及ぼす運動と加齢の影響—多機能型非観血式血圧計測システムによる評価—

島根医科大学・生理学・環境生理学¹, 同・環境保健医学・環境予防医学²
島根女子短期大学家政科食物専攻³

橋本 道男¹, 塩飽 邦憲², 乃木 章子³, 藤井 由己¹, 北島 桂子², 川北 映輔¹
山根 洋右², 紫藤 治¹

持続的な血流増加や血中脂質組成変化により血管弾性機能は影響を受ける。特に、運動時での血流増加に伴うシヤストレスの増大刺激に対する血管内皮細胞の機能変化には興味もたれている。我々の研究室では以前、強制運動を负荷したラットでは、血管拡張物質である ATP の尾動脈内皮細胞からの遊離量が増大する事、さらに、運動によるこれら血管内皮依存性の適応変化には、血漿・血管壁の脂質代謝が深く関与する可能性を報告した(Am. J. Physiol., 1999)。最近、本学の生理学実習や、市民主体型「生活習慣病予防プログラム」の開発研究に携わる過程で、新規に開発されたトノメトリー法による多機能型非観血式血圧計測システムを用いてヒトの血管機能評価を行ったところ、運動や加齢による血管機能変化について興味ある知見が得られたので報告する。

【方法】：島根医科大学 3 年生学生(約 200 名)、出雲市・佐田町住民(約 200 名)を対象に疫学調査を行い、調査表記入方法で食生活、運動量を把握した。また、一部は「運動により減量と高脂血症を解消する」事を目的とした市民参加の行政介入方式により、循環機能・血清脂質組成に及ぼす運動の影響に就いて検討を行った。測定項目：1) インピーダンス式体脂肪率・肥満度指数の測定、2) 多機能型非観血式血圧計測システムによる、血圧、心拍出量、大・小動脈弾性係数、全身血管抵抗、3) 血漿の総コレステロール(C), LDL-C, HDL-C, 中性脂肪, リン脂質(以上は酵素法), 脂肪酸組成(ガスクロマト法)

【結果】：1) 加齢に伴う血圧の上昇と共に、大・小動脈弾性係数は共に減少し、全身血管抵抗は増加した。2) 運動部所属学生は非所属学生に較べて、拡張期血圧・全身血管抵抗が低下し、小動脈弾性係数・1 回心拍出量が増加した。3) 介入試験結果では、介入前後の一日当たり歩数が 2,000 歩以上の増加群では、非改善群に較べ、体重・拡張期血圧・LDL C・LDL-C/HDL-C 比が低下し、小動脈弾性係数が有意に増加した。

【考察・結論】：本研究で用いた多機能型非観血式血圧計測システムは、圧脈波を解析することにより血管機能を評価しており、特に小動脈弾性係数の変化は血管内皮細胞機能を反映することが示唆されている。加齢による血圧上昇には血管内皮機能の低下が深く関与していることが知られている。本研究において、年齢差には関係なく、運動負荷による拡張期血圧と小動脈弾性係数等への改善効果が認められたことは、ヒトにおける運動による血管内皮依存性反応への適応変化が推察される。

19. Sphingosylphosphorylcholine (SPC) induces myosin light chain phosphorylation

Department of Molecular Physiology, Yamaguchi University School of Medicine

Hongyan Wang, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi

Rho-kinase plays a critical role in Ca^{2+} sensitization of vascular smooth muscle contraction through the phosphorylation of myosin phosphatase target subunit 1 and CPI17, which results in a decrease in myosin light chain phosphatase activity. Previously we reported that sphingosylphosphorylcholine (SPC) induced Rho-kinase-mediated Ca^{2+} sensitization in vascular smooth muscle. However, whether SPC can modulate the phosphorylation of regulatory myosin light chain (MLC20), a downstream molecule of Rho-kinase, remains to be analyzed. Here we examined the change in the MLC20 phosphorylation in porcine coronary smooth muscle during SPC stimulation. Porcine coronary arteries were cut into strips (2×5 mm) without endothelium and adventitia. These strips were mounted vertically at the organ bath filled with physiological salt solution and isometric force was measured by a force transducer. The strips were frozen by liquid nitrogen at various time points after $30 \mu\text{M}$ SPC stimulation. MLC20 phosphorylation was analyzed by Glycerol-PAGE and Western blot using the primary antibodies against MLC20 and phosphorylated MLC20. SPC induced the phosphorylation of MLC20. The phosphorylation level was maximum at 5 min after SPC stimulation. This finding is consistent with our previous report which indicated that SPC induces Rho-kinase mediated Ca^{2+} sensitization in vascular smooth muscle.

20. スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) によるカルシウム感受性増強のシグナル伝達における Src family チロシンキナーゼの下流分子の検索

山口大学・医・器官制御医科学・分子細胞生理学

岸 博子, 中山 仁美, Hongyan Wang, 佐藤 正史, 最上紀美子, 小林 誠

(背景と目的) 血管の異常収縮状態である血管攣縮の病態生理において, Rho キナーゼによる血管平滑筋収縮のカルシウム感受性増強は中心的な役割を果たす. 我々はこれまでの研究において, 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) が Rho キナーゼを介して血管平滑筋収縮のカルシウム感受性を増強させ, 細胞内カルシウム濃度上昇を伴わない平滑筋収縮を起こす事を報告した. さらに我々は, 非レセプター型チロシンキナーゼの一種である Src family チロシンキナーゼによる Rho キナーゼの活性化が, この SPC による血管平滑筋収縮のカルシウム感受性を増強に必要である事を報告してきた. しかし, Src family チロシンキナーゼが Rho キナーゼの活性化させる機構の詳細は不明であった. そこで, 我々は SPC 収縮における Src family チロシンキナーゼの下流分子を抗リン酸化チロシン抗体 RC20 を用いて検索した. (方法) プタ冠状動脈平滑筋を SPC で収縮させ, 種々の時間経過で標本を液体窒素で急速凍結・粉碎して lysate を作成し, 抗リン酸化チロシン抗体 RC20 で Western Blot を行い, SPC 刺激によってチロシンリン酸化レベルが変動する蛋白分子を検索した. また, Src family チロシンキナーゼ阻害剤である PP2, EPA の SPC 刺激による収縮およびチロシンリン酸化レベルに対する影響も検討した. (結果) SPC 収縮に伴い, チロシンリン酸化レベルが変動する蛋白が複数観察された. このうち, p60 は SPC 刺激に伴い経時的にチロシンリン酸化, p25 はチロシン脱リン酸化された. 更に, Src family チロシンキナーゼ阻害剤 PP2 および EPA はこの SPC による p60 のチロシンリン酸化および p25 のチロシン脱リン酸化を収縮と同様に抑制した. (考察) p60 および p25 は SPC-Src family チロシンキナーゼ-Rho キナーゼ系による平滑筋収縮のカルシウム感受性増強のシグナル伝達において, Src family チロシンキナーゼの下流分子であると考えられた.

21. 平滑筋収縮時のミオシン軽鎖カイネース活性

東京医科歯科大学・脳神経外科¹, Dept. of Physiology, UT Southwestern Medical Center²

磯谷 栄二¹, Kristine E Kamm², James T Stull², 大野喜久郎¹

【目的】平滑筋の収縮については、myosin light chain kinase (MLCK) の果たす役割が重視されていたが、近年 rho kinase や CPI17 といった myosin phosphatase inhibitor が注目を集めている。CaM Sensor MLCK Transgenic Mouse を作成し、種々の平滑筋収縮時の MLCK 活性の同時測定を試みた。【方法】平滑筋 MLCK の C 末端に二種類の GFP protein, EYFP と ECFP を calmodulin (CaM) binding site で結合させたものを ligation し、これを smooth muscle specific promoter を有する vector に subcloning した。この plasmid を用いて transgenic mouse を作成した。この mouse から平滑筋組織を摘出し、張力と同時に GFP protein 間の Energy Transfer (FRET) を測定することで、MLCK 活性の変化をとらえた。【結果】1. 蛍光顕微鏡下で平滑筋からの蛍光を選択的にとらえた。2. 平滑筋の Skinned fiber 標本で、Ca²⁺ 濃度依存性の収縮と FRET の変化が同時に観察された。3. 平滑筋摘出標本において、KCl 誘発収縮とカルバコール誘発収縮で MLCK 活性に有意差がみられた。4. Y27632 によって KCl 誘発収縮とカルバコール誘発収縮はともに強く抑制され、KCl 誘発収縮時の MLCK 活性も同時に抑制された。【総括】平滑筋収縮時の MLCK 活性を同時測定することで、脱分極による収縮とアゴニスト誘発収縮におけるシグナル伝達の相違をとらえた。いずれの収縮においても rho kinase の関与が強く示唆された。Rho kinase inhibitor である Y27632 の前投与で、KCl 誘発収縮および MLCK 活性が抑制されたことで、従来 Ca²⁺ 依存性と考えられていた KCl 誘発収縮時の signaling に Ca²⁺ 非依存性の経路の関与が示唆された。

22. 平滑筋収縮時におけるミオシンのリン酸化に対する Rho シグナルの時空間的関与の検討

北里大学医・内科学 IV¹, マサチューセッツ州立大学医学校・生理学²

宮崎 浩二¹, 池辺 光男², 東原 正明¹

低分子量 G タンパク質 Rho-Rho キナーゼシグナルは平滑筋収縮におけるミオシンリン酸化を MLCK 以外の機序で修飾している。また、低分子量 G タンパク質やその標的である Rho-キナーゼは活性化すると膜に移行する。しかし、膜を中心とする収縮シグナルと平滑筋細胞内に充満している収縮蛋白質ミオシンのリン酸化との時空間的な相関関係はいまだはっきりとは解明されていない。

我々は、培養平滑筋細胞に緑色蛍光蛋白質でラベルした Rho 蛋白を強制発現させ細胞内局在の経時的变化を観察したところ、Rho 蛋白質は約 1 分以内に細胞膜に移動しはじめ 5 分くらいでほぼ最大になった。また、細胞内ミオシンリン酸化レベルをリン酸化ミオシン軽鎖特異的モノクローナル抗体を用いて測定したところ、Rho シグナルは筋収縮の比較的遅い tonic phase においてミオシンリン酸化に関与していることがわかり、これは Rho の膜への移行と時期的に合っていた。さらに間接蛍光抗体染色により平滑筋細胞におけるミオシンリン酸化レベルの空間的推移を観察した。刺激直後のリン酸化の最大の時期では細胞内のミオシンが瀰漫性にリン酸化されているが、tonic phase におけるミオシンリン酸化は主に細胞膜周囲でおこっており、活性化された Rho-Rho キナーゼが移動した先の細胞膜でミオシンのリン酸化を促していることを示唆した。現在、Rho-キナーゼがリン酸化するといわれているミオシンフォスファターゼの large subunit とフォスファターゼインヒビターである CPI 17 の細胞内局在変化を調べることによって、Rho-Rho キナーゼのシグナルがいかにミオシンリン酸化を促すか、すなわちミオシンフォスファターゼを介するか直接リン酸化するか、もし介するならミオシンフォスファターゼのリン酸化によるのか CPI 17 の活性化によるのかについて検討中である。

23. HSP20p はどのようなメカニズムで平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性を増強するのか？ — モルモット盲腸紐トリトン X-100 処理スキンドファイバーを用いた検討 —

東京医科大学・生理学第一¹, 九州大学・医・臨床薬理学²

吉野 恭正¹, 渡辺 賢¹, 森本 幸生²

Heat shock protein 20 (HSP20) はアクチン結合能を持ち, そのアクチン結合部位 (残基 110-121) はトロポニン I 抑制領域 (骨格筋; 残基 104-115) と相同性が高い. このアクチン結合部位由来の合成ペプチド (HSP20_{p110-121}) は豚頸動脈トリトン X-100 処理スキンドファイバー収縮を抑制するため, トロポニン I 様のメカニズムで血管平滑筋の細いフィラメント側収縮制御を行っていると考えられる (Rembold CM et al. J Physiol 524; 865-878, 2000). ところがモルモット盲腸紐 β エスチン処理スキンドファイバーでは, Ca^{2+} 活性化収縮時に最大収縮張力を抑制するだけでなく, 収縮の Ca^{2+} 感受性をあげるという 2 つの作用を持つ (吉野ら, 第 80 回日本生理学大会, 2003). HSP20p は高濃度 Mg^{2+} によるリン酸化非依存性収縮やチオリン酸化スキンド標本の MgCTP による収縮を抑制するため, 盲腸紐スキンドファイバーでも細いフィラメントに直接結合する事でクロスブリッジを抑制すると考えられる. 一方, HSP20p による収縮の Ca^{2+} 感受性増強は, HSP20p による収縮タンパク質系への直接効果ではなく, 収縮制御のもっと上流に働いている可能性がある. なぜなら, β エスチン処理スキンド標本では, 細胞膜を介する情報伝達系の少なくとも一部が残存しているからである. そこで, トリトン X-100 によってスキンド処理を行い, それらの細胞内情報伝達系を破壊した盲腸紐標本の収縮反応に対する HSP20p の影響を検討した. トリトン X-100 処理標本においても β エスチン処理標本と同じく, HSP20p は最大収縮を抑制する一方で, 収縮の Ca^{2+} 感受性を増強した. HSP20p は盲腸紐の収縮タンパク質系に直接作用することで収縮の Ca^{2+} 感受性を増強することが示唆された.

24. マウス胃に存在する ICC 細胞内 Ca oscillation 機構

名古屋大学・医・細胞情報医学細胞生理学

劉 紅年, 中山 晋介

消化管における ICC (Cajal の間質細胞: Interstitial cells of Cajal, ICC) 細胞内の Ca oscillation 機構は, 自発性電気活動の根元的メカニズムと考えられている. マウス小腸筋層 (筋層間神経叢含む) から作成される培養細胞小塊 (cell cluster) 標本は, 平滑筋, ICC, 腸管経壁内神経細胞を含む最小集積型腸管運動ペースメーカーモデルである. 今回, 私はマウス胃においても同じように自発性 Ca oscillation を示す細胞小塊標本の作成に成功したので, 諸性質を調べた.

(方法) BALB/C マウス (生後 10-20 日) の胃筋層を摘出した後に, Ca free 液中で酵素処理することにより細胞小塊標本と作成した. 2-3 日の培養後に, fluo-3AM を室温で 3-4 時間ロードした. 細胞内に取り込まれた Fluo-3 の蛍光強度変化を, Ca 濃度変動の指標として記録した (実験温度 37°C). いくつかの標本において Ca 測定後抗 c-Kit 抗体 (ACK-2) で染色を行った. 複数の ICC 細胞内 Ca 濃度変動の同期は相互関係によって評価を行った.

(結果) 100 μM オーダーの細胞小塊標本内に 1~数ヶ所の自発的 Ca 濃度変動を示す部位が観察された. 小腸から得られる細胞小塊内の Ca oscillation はほぼ同時におこるが, 胃から得られた標本では, 同時に Ca oscillation がおこる場合と, 位相差を伴って同期した Ca oscillation が観察された. Nifedipine 1 μM 存在下でも, この周期的 Ca oscillation は観察され, IP_3 受容体ブロッカーである 2APB 1~10 μM 投与によりほぼ完全に抑制された. 一方, ryauodine 受容体ブロッカー投与によっても, Ca oscillation は完全に抑制された. また, 細胞外 Ca 除去や trp channel 拮抗薬として知られる SKF84345 投与も著明な抑制を引き起こした. これらの結果をもとに, 胃筋層に存在する ICC 細胞内 Ca oscillation 機構について考察する.

25. モルモット盲腸紐における低酸素条件下でのミオシン変形成変化とシグナル伝達系変化の相関

日本大学・生物資源・獣医生理¹, 東京大学・農学生命・獣医薬理², シンシナティ大学・医・分子細胞生理¹

小林麻須美¹, 金山 喜一¹, 尾崎 博², 唐木 英明², 石田 行知³, Richard J. Paul³

平滑筋の中でモルモット盲腸紐は酸素依存性が大きい。細胞内タンパク質の変化を調べていたところ、低酸素条件下でミオシンが細胞質画分から消失するように見える現象を検討したところ、低酸素によりミオシン沈降能が増加していることが判明した。今回は、この沈降能の変化と細胞内情報伝達物系、MAPK および PKC の変化の相関を報告する。【方法】低酸素条件は 95% O₂ の代わりに 95% N₂ 通気を用いた。各種タンパク質レベルの変化は、ウェスタンブロットにより観察した。遠心法により細胞質および膜画分を得た。【結果および考察】高濃度 K 存在下で低酸素導入は、盲腸紐を急速に弛緩させ、その弛緩反応は約 5 分で最大に達する。細胞質画分のミオシン量は、低酸素後 15 分でわずかに減少し、30 分以降ではほとんど消失していた。再酸素通気をするところのミオシン量は 5 分以内にほぼ元のレベルに回復した。遠心しない素抽出液では低酸素によるミオシン消失は観察されなかった。ミオシンの沈降係数は、好氣的条件では 6S に、低酸素条件では 10S に最大分布を示した。低酸素状態の盲腸紐からの素抽出液中のミオシン ATP 活性は好氣的状態からのものの 1/3 であった。ミオシン軽鎖リン酸化量は好氣的と低酸素条件で変化がなかった。低酸素が引き起こすミオシンの沈降能の増加は外液 Ca²⁺ に依存していた。シグナル伝達物質である、PKC β 2 と MAPK のリン酸化レベルは高濃度 K 存在する低酸素条件で減少し、特に MAPK リン酸化レベルの変化はミオシン沈降能の変化とほぼ一致していた。上記のタンパク質レベルの変化は弛緩反応に遅れて観察される。Phosphocreatine および ATP 濃度変化を含め経時変化を考慮すると、低酸素条件ではミオシンが ATP を消費し、細胞内リン酸化ポテンシャルが低下したため、上記のタンパク質リン酸化レベルが低下し、ミオシン沈降能が変化したと考えられる。全体の詳細な相互関係は未だ不明である。

26. Ileo-jejunal transposition の回腸縦走平滑筋収縮に対する効果の in vitro での検討

東北大学・医・生体調節外科¹, みやぎ県南中核病院²

柴田 近¹, 舟山 裕士¹, 福島 浩平¹, 高橋 賢一¹, 橋本 明彦¹, 長尾 宗紀¹
羽根田 祥¹, 渡辺 和宏¹, 内藤 広郎², 松野 正紀¹, 佐々木 巖¹

【背景】Ileo-jejunal transposition (IJT) は遠位回腸の一部を順蠕動性に近位空腸へと間置する術式であり、これによって回腸から分泌される PYY などの peptides の血中濃度が上昇するために胃排出が遅延することをわれわれは過去に報告した。このような IJT の運動抑制効果は、大腸全摘後の難治性下痢の治療に臨床応用できる可能性がある。しかしながら、IJT の小腸運動に対する効果は知られていない。【目的】IJT の回腸縦走平滑筋に対する効果を in vitro で検討すること。【方法】体重 250 g 前後の SD ラットを用い、対照群、IJT 群(全空回腸の 1/4 の長さの遠位回腸を順蠕動性に近位空腸へと間置)、Sham 群 (IJT に相当する部位で小腸を 3 カ所切離、再吻合) の 3 群を作製した。IJT 群と Sham 群では術後 12-16 週経過した時点で実験に用いた。回腸末端から約 10 cm の回腸から、長さ 10 mm、幅 2 mm の縦走筋標本を作製し、tissue chamber 内に吊るして in vitro での isometric な平滑筋収縮を測定した。縦走筋標本を少しずつ伸展させて自発性収縮を測定した後、コリン作動薬であるベサネコール (10⁻⁷-10⁻⁴ M)、アドレナリン作動薬であるノルエピネフリン (10⁻⁸-10⁻⁴ M) に対する反応、電気刺激に対する反応、を 3 群間で比較・検討した。【結果】自発性収縮は IJT 群で対照群に比べて有意に低下していた。IJT 群で 10⁻⁶ M 以上のベサネコールに対する反応は他の 2 群に比べて亢進していたが、最大反応の 50% の反応を得るための用量は 3 群で差がなかったことから hypersensitivity ではないと考えられた。ノルエピネフリンに対する反応と電気刺激に対する反応は 3 群間で差がなかった。【結語】IJT により回腸縦走筋の自発性収縮が低下し、コリン作動薬に対する反応の亢進が認められた。このような IJT の小腸運動抑制効果は、IJT の下痢改善効果つながらる可能性を示していると思われた。

27. Delphinidin-3-rutinoside (D3R) の NO を介したウシ毛様体平滑筋弛緩反応

明治製菓 (株) ヘルス・バイオ研¹, University of Texas South Western Medical Center²
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所³

松本 均^{1,2,3}, Kristine E. Kamm², James T. Stull², 東 洋³

D3R はカシス (*Ribes nigrum* L.) に含まれる主要アントシアニン成分である。アントシアニン類の視覚改善効果は良く知られているが、詳細な作用機序は不明である。本研究ではウシ毛様体平滑筋における D3R の弛緩反応機序を解析した。Endothelin-1 誘発収縮下に、D3R (3×10^{-5} M) は緩徐な弛緩反応を惹起したが、carbachol 誘発収縮下には弛緩反応を示さなかった。D3R (10^{-4} M) の前処置により、endothelin-1 誘発収縮は抑制された。Western blot 法で測定した myosin light chain のリン酸化も、D3R により抑制されており、D3R の endothelin-1 誘発収縮抑制作用の一部が裏付けられた。D3R による endothelin-1 誘発収縮の抑制作用は、NOS 阻害剤 (N^G -nitro-L-arginine (NOARG)), NO 除去剤 (carboxy-PTIO), guanylate cyclase 阻害剤 (ODQ), 選択的 ETB レセプター阻害剤 BQ788 によって阻止された。NOARG による阻止効果は、過剰量の L-arginine 添加によって消失した。D3R 誘発の弛緩反応は、cyclic GMP の産生増加を伴っていた。以上のことから、D3R は ETB 受容体活性化による NO-cyclic GMP 産生亢進を介して毛様体平滑筋の弛緩を惹起することが示唆された。一方 K^+ channel 阻害剤 (iberiotoxin), β -adrenoceptor 阻害剤 (propranolol), cyclooxygenase 阻害剤 (indomethacin) は、D3R 誘発弛緩に影響しなかったため、これらの pathway は関与していないことが示唆された。同じアントシアニンである cyanidin-3-rutinoside も D3R と同様の効果を惹起したが、フラボノイド類である myricetin-3-rutinoside, quercetin-3-rutinoside には見られなかった。

28. トロポニン I 抑制領域由来ペプチドは平滑筋アクチン・ミオシン相互作用を直接的に抑制する

東京医科大学生理学第一¹, 九州大学・医・臨床薬理学²

渡辺 賢¹, 吉野 恭正¹, 森本 幸生²

トロポニン I 抑制領域 (骨格筋; 領域 104-115, 心筋; 領域 136-147) 由来ペプチド (TnIp) は、モルモット盲腸紐スキンド標本の収縮反応を、 Ca^{2+} 濃度やミオシン軽鎖リン酸化レベルに非依存的に抑制する。

TnIp による平滑筋収縮抑制メカニズムを明らかにするため、TnIp のアナログがモルモット盲腸紐スキンド標本に与える影響を検討した。In vitro での骨格筋アクトミオシン ATPase 活性抑制に必須である TnIp の 2 個のアルギニン (心筋型 TnIp の Arg₍₁₄₄₎, Arg₍₁₄₇₎) をグリシンに置換したアナログは、盲腸紐スキンド標本の Ca^{2+} 活性化収縮や高 Mg^{2+} によるミオシンリン酸化非依存性の収縮張力発生に影響を与えなかった。このことは、TnIp がアクチン・ミオシン相互作用を直接抑制することによってモルモット盲腸紐収縮を抑制することを示唆する。平滑筋においてもトロポニン I 同様のメカニズムで細いフィラメント側収縮制御が行われうることが結論された。

29. カテコラミン刺激により誘発される消化管平滑筋弛緩反応に関与する β -アドレナリン受容体サブタイプとその部位差

東邦大学・薬・薬理学

堀之内孝広, 田中 芳夫, 小池 勝夫

【目的】カテコラミンにより生じる消化管平滑筋の弛緩反応は、 β_1 -アドレナリン受容体(β_1 -AR)を介していると考えられている。しかしながら、我々は、モルモット消化管において、 β_3 -ARもまた、平滑筋弛緩反応に関与している可能性を報告してきた。本研究では、モルモット消化管における平滑筋弛緩反応に関与する β -ARサブタイプの分布を明らかにするため、食道・胃底・十二指腸・回腸・盲腸紐の5つの部位を用い、張力測定実験及びRT-PCR法によるmRNA発現確認実験を行った。【方法】張力測定実験では、カテコラミン(Isoprenaline (ISO), Epinephrine (Epi), Norepinephrine (NE))による弛緩反応から、各薬物の効力(pD₂値)を算出し、効力順位に基づいてサブタイプの分類を行った。RT-PCR法によるmRNA発現確認実験では、100 ngのmRNAに相当するcDNAを鋳型としてPCRを行った。【結果】 β_1 -、 β_2 -AR拮抗薬非存在下、食道におけるカテコラミンの効力順位は、ISO>Epi=NEとなり、 β_1 -ARの効力順位と一致した。胃底・十二指腸・回腸では、 β_1 -、 β_2 -AR拮抗薬非存在下及び盲下において、ISO>NE>Epiとなり、 β_3 -ARの効力順位と一致した。一方、盲腸紐において、 β_1 -、 β_2 -AR拮抗薬非存在下では、ISO>Epi>NEとなり、 β_2 -ARの効力順位と一致したが、 β_1 -、 β_2 -AR拮抗薬存在下では、ISO>NE>Epiとなり、 β_3 -ARの効力順位と一致した。また、RT-PCR法により、食道では β_1 -、 β_2 -ARのmRNAの発現が確認され、胃底・十二指腸・回腸・盲腸紐では、 β_1 -、 β_2 -、 β_3 -ARのmRNA発現が確認された。【結論】以上の結果から、モルモット消化管平滑筋において、食道では β_1 -AR、胃底・十二指腸・回腸では β_3 -AR、盲腸紐では β_2 -、 β_3 -ARがそれぞれの弛緩反応に関与していることが示された。また、mRNAレベルにおいて、これらの弛緩反応に関与しているサブタイプの発現が確認された。

30. モルモット回腸縦走筋におけるムスカリン受容体作動薬による収縮反応に対する各種MAP kinase阻害薬の作用

日本大学・薬・機能形態学¹, 東邦大学・薬・薬理学²

齋藤 清茂¹, 木澤 靖夫¹, 小池 勝夫², 草間 貞¹

【目的】平滑筋収縮において、ミオシン軽鎖(myosin light chain, MLC)のリン酸化が重要であることは広く認められているが、MLCのリン酸化レベルの変化を伴わない平滑筋収縮も報告されている。しかしながら、MLCのリン酸化に依存しない収縮経路に関しては未だ不明な点が多い。近年、MLCリン酸化非依存性収縮との関連が示唆されているアクチン結合タンパク質がMAP kinaseファミリーのextracellular signal-regulated kinaseやp38 MAP kinaseを介した経路によりリン酸化されることが示された。我々は、これまでにムスカリン受容体を介したモルモット回腸縦走筋の収縮反応において、完全活性薬と部分活性薬とでは細胞内Ca²⁺濃度と発生張力との関係が異なり、その相違がMLCのリン酸化に依存しない経路によるものである可能性を報告した。そこで、本研究ではモルモット腸管平滑筋収縮におけるMAP kinase系の役割を明らかにするために、ムスカリン受容体作動薬の収縮反応に対する各種MAP kinase阻害薬の作用について検討した。

【結果及び考察】モルモット回腸縦走筋において、MEK阻害薬であるPD98059及びp38 MAP kinase阻害薬SB203580はムスカリン受容体作動薬による収縮反応を濃度依存的に抑制し、いずれの阻害薬も収縮の初期相よりも持続的収縮相を強く抑制した。また、PD98059, SB203580をそれぞれ単独で処理したときと比較すると、ムスカリン受容体作動薬による収縮反応に対する抑制作用はPD98059とSB203580との併用により有意に増大した。さらに、c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)阻害薬であるSP600125は、ムスカリン受容体作動薬による収縮反応(持続的収縮相)を濃度依存的に抑制した。MLC kinase阻害薬存在下において、ムスカリン受容体作動薬はMLCリン酸化量の増加を伴わない収縮反応を引き起こし、この収縮反応はPD98059, SB203580及びSP600125によりそれぞれ有意に抑制された。これらの結果は、3種のMAP kinaseがモルモット腸管平滑筋の持続的収縮やMLCリン酸化非依存性収縮に関与している可能性を示唆している。

31. β_2 -アドレナリン受容体刺激に伴う気管平滑筋の弛緩反応機構：イソプレナリンによる cAMP を介さないモルモット気管筋の弛緩機序とマキシ K チャネル活性化の関連性について

東邦大学・薬・薬理

山下 庸子, 八巻 史子, 堀之内孝広, 田中 芳夫, 小池 勝夫

【目的】 β -アドレナリン受容体 (β -AR) は現在のところ, 3 種類のサブタイプ ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$) に分類されている。このうち, 気管平滑筋の弛緩反応には主として β_2 -AR が関与する。 β_2 -AR 刺激に伴う気管平滑筋の弛緩反応は, 従来, 細胞内 cAMP の上昇を介すると考えられてきたが, 最近, 大コンダクタンス Ca^{2+} 感受性 K^+ (マキシ K) チャネルの関与も示唆されている。しかし, cAMP とマキシ K チャネル活性化の関連性については詳細な検討はされていない。本研究では, β_2 -AR を介する気管平滑筋の弛緩反応に対するマキシ K チャネルの寄与について, cAMP の役割との関連性の観点から検討を行った。【方法】モルモットから摘出した気管組織をヒスタミンで収縮させ, カテコラミン(イソプレナリン, ISO; アドレナリン, Ad; ノルアドレナリン, NA)による濃度-弛緩反応関係に対する各種阻害薬の効果を解析した。【結果】① 3 種類のカテコラミンの弛緩作用の効力順位は, ISO ($\text{pD}_2, 8.20$) > Ad (7.00) > NA (5.80) であった。② Butoxamine (選択的 β_2 -AR 遮断薬) は ISO の弛緩作用を競合的に遮断し, その pA_2 値は 6.58 であった。③ ISO の弛緩作用は IbTx (マキシ K チャネルの選択的阻害薬) により顕著に抑制された。④ ISO による濃度-反応関係は RO-20-1724 (cAMP 特異的ホスホジエステラーゼ阻害薬, 10^{-8} - 10^{-6} M) 存在下で左方に移動した。⑤ アデニル酸シクラーゼ阻害作用を有する SQ22, 536 (10^{-4} M) は, ISO の弛緩作用に影響しなかった。⑥ ISO による弛緩反応の RO-20-1724 存在下で増強された成分, 及び SQ22, 536 非感受性の成分はいずれも IbTx で有意に減弱した。⑦ 高カリウム (80 mM-KCl) 溶液で収縮させた気管では, ISO の弛緩作用はほとんど消失した。【考察】本実験結果から, β_2 -AR を介する気管平滑筋の弛緩反応にマキシ K チャネルが重要な役割を果たすことが明らかとなった。また, β_2 -AR - マキシ K チャネルの機能的共役系に, cAMP を介する機構以外に, cAMP を介さない機序も関与する可能性が示唆された。

32. マウス回腸における apamin 感受性 SK channel の発現

大阪府立大学・農生命・獣・応用薬理

藤田 秋一, 末永 清剛, 藤波かおり, 置塩 豊, 竹内 正吉, 畑 文明

Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK) channel の遮断薬である apamin が消化管における自発性運動に影響を及ぼす, あるいは神経刺激による抑制性接合部電位 (i.j.p.) を抑制することが知られている。今回マウス回腸での弛緩反応が SK channel の阻害薬である apamin により阻害されることを認めたので, マウス回腸での apamin 感受性 SK channel の発現について検討した。【結果】マウス回腸条片の電気刺激による弛緩は apamin により著しく抑制された。現在までにクローニングされている SK channel の内 (SK1-SK4), apamin 感受性であるのは SK2 と SK3 である。そこで抗 SK2 および抗 SK3 抗体を用いてマウス回腸標本で免疫染色を行った。SK3 の陽性細胞の多くは myenteric plexus (MY) 層で編目構造を形成しており, また輪走筋層内に多く見られた。またカハールの介在細胞 (ICC) のマーカーである c-kit 抗体との二重染色の結果, SK3 と c-kit の陽性像はそれぞれ別の細胞に存在した。また抗神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 及び抗 SK3 抗体との二重染色の結果, 両者の陽性細胞は非常に隣接していた。さらに SK3 陽性細胞は fibroblast 細胞のマーカーである prolyl 4-hydroxylase (PH(α)) を発現していた。免疫電顕での検討により, 抗 SK3 抗体の免疫反応は, fibroblast 細胞様の形態をもち, そして隣接する平滑筋細胞と gap junction を形成していた。一方, SK2 の免疫反応は上皮細胞のパネート細胞および MY 層に見られ, 平滑筋細胞あるいは ICC などには全く確認されなかった。【考察】以前の報告で消化管壁には ICC と同じように突起構造をもち, そして c-kit 発現陰性の細胞 (fibroblast-like cell) が確認されており, 今回の結果から SK3 channel はこの fibroblast-like cell に発現することが示唆された。さらに SK3 陽性細胞は nNOS を発現する神経と隣接しており, また fibroblast-like cell は平滑筋細胞と gap junction を形成することから, 一酸化窒素がメディエイトする神経伝達経路に関与する可能性が考えられる。

33. ラット空腸弛緩に関わる抑制性神経伝達物質

大阪府立大学・獣医・応用薬理¹, 岐阜大学・獣医・家畜生理²

竹内 正吉¹, 早稲田かおり¹, 藤波かおり¹, 置塩 豊¹, 藤田 秋一¹, 武脇 義²
畑 文明¹

これまでにラット空腸の弛緩には一酸化窒素の関与は認められず, neurotensin (NT) が一部その役割を担っていることを示唆した. 今回, 空腸での NT 以外の抑制性神経伝達物質について検索した. 【方法】8 週齢 Wistar ラットから空腸条片を採取し, $1 \mu\text{M}$ atropine, $5 \mu\text{M}$ guanethidine 存在下に, 経壁電気刺激 (EFS; $0.1\text{--}10 \text{ Hz}$, 0.5 msec duration, 30 V) による縦走筋方向の運動を記録した. 【結果】① EFS による NANC 性弛緩は, $0.1\text{--}1 \text{ Hz}$ で刺激頻度依存性に大きくなったが, 10 Hz では弛緩の途中から収縮が生じるため弛緩は小さくなった. これらの弛緩は apamin により約 90% 抑制された. ② 外から適用した ATP は一過性の弛緩を生じた. ATP 反復適用により生じた脱感作条件下で, EFS による弛緩は 50-60% 抑制された. P2 受容体拮抗薬である A3P5PS は ATP 脱感作と同程度に EFS による弛緩を抑制した. ③ EFS による弛緩は $\alpha\text{-chymotrypsin}$ により約 50% 抑制され, 残った弛緩は A3P5PS によりさらに抑制された. ④ 外から適用した ATP による TTX 非感受性の弛緩は apamin によりほぼ完全に抑制された. ⑤ NT 脱感作は ATP による弛緩に影響せず, また, ATP 脱感作は NT による弛緩に影響しなかった. ⑥ Tyrosine kinase 阻害剤は EFS による弛緩に全く影響しなかった. ⑦ 筋小胞体の $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 阻害剤 thapsigargin は EFS と ATP による弛緩を著しく抑制した. 【考察】ラット空腸における抑制性神経伝達物質として NT に加え, ATP がその役割を担っていることが明らかとなった. また, その弛緩の細胞内機序に筋小胞体から遊離される Ca^{2+} や SK チャネルが関与していることが示唆された.

34. モルモット結腸紐平滑筋における NKA による強収縮のメカニズム

九州大学・医・小児外科

中辻 隆徳, 家入 里志, 水田 祥代

【背景】Neurokinin A (NKA) はヒトおよび動物の神経終末に存在する神経ペプチドで, 消化管平滑筋の生理的な収縮を司ることが知られており, 下部食道, 回腸及び結腸などのヒト標本での収縮が確認されている. 一方, NKA は収縮時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化や収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性に与える影響については完全には明らかにされていない. そこで NKA による収縮のメカニズムを検討した. 【方法】NKA によるモルモット結腸紐平滑筋の収縮機序を細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) と張力の同時測定法を用いて検討した. Control として 5.9 mM K^+ 及び 60 mM K^+ による刺激を行いそのときの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及び発生張力をそれぞれ 0% 及び 100% とした. 【結果】NKA ($100 \text{ pM}\text{--}10 \mu\text{M}$) はモルモット結腸紐平滑筋において濃度依存性に収縮を引き起こした. 最大反応は $1 \mu\text{M}$ で得られ, EC_{50} は $84.1 \pm 12.9 \text{ nM}$ であった. $1 \mu\text{M}$ NKA は $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を伴う張力を発生し, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と発生張力の最大値はそれぞれ 5 と $153 \pm 22.8\%$ であった. ($n=9$) Ca^{2+} 流入経路を調べるために電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害薬である diltiazem ($10 \mu\text{M}$) を前処置したところ, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と発生張力はそれぞれ $35.8 \pm 6.59\%$ と $3.90 \pm 1.79\%$ まで有意に抑制された. ($n=5$, $p < 0.001$) NK1 receptor 阻害薬 TAK-637 ($1 \mu\text{M}$) と NK2 receptor 阻害薬 NK2-ra ($1 \mu\text{M}$) の前処置では, 前者は抑制を認めなかったが後者では $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と発生張力はそれぞれ $66.6 \pm 11.1\%$ と $51.5 \pm 14.0\%$ まで有意に抑制された. ($n=6$, $p < 0.01$) また Rho kinase 阻害剤である Y-27632 の前処置では, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と発生張力はそれぞれ $89.2 \pm 17.3\%$ と $68.6 \pm 6.41\%$ であった. ($n=3$) 【結論】NKA はモルモット結腸紐平滑筋において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を伴う濃度依存性の収縮を引き起こし, その収縮には主に電位依存性 Ca^{2+} チャネルと NK2 receptor を介した細胞外から Ca^{2+} の流入が関与しさらに Rho kinase を介して収縮装置の Ca^{2+} 感受性を上昇させ, 収縮力の増強をもたらす結腸の強収縮に関与する可能性があることと示唆された.

35. モルモット盲腸紐における各種 PDE 阻害剤による弛緩と環状ヌクレオチドの関連

日本獣医畜産大学・獣医薬理学

金田 剛治, 清水 一政, 浦川 紀元, 中條真二郎

ホスホジエステラーゼ (PDE) には多くのアイソザイムがあり, PDE1 から 5 型にはそれぞれ選択的な阻害剤が存在する. これらの阻害剤による弛緩の効力には, 差異があり, その弛緩は環状ヌクレオチドの変化が関連することが示唆されてきた. しかし, 腸管平滑筋ではこれらの阻害剤による弛緩の効力の差異を示した報告はあるが, PDE1 から 5 型の阻害剤の弛緩と環状ヌクレオチドの関連を示した報告はない. また, PDE1 および 2 型阻害剤は弛緩と関連する環状ヌクレオチドが血管および膀胱平滑筋では異なることが報告されている. そこで, 我々はモルモット盲腸紐のカルバコール収縮に対する各種 PDE 阻害剤の収縮抑制効力を比較するとともに, 各 PDE 阻害剤による cAMP および cGMP 含量の変化を調べ, 弛緩と cAMP および cGMP の関連について検討した.

モルモット盲腸紐において, PDE1 から 5 型の阻害剤はいずれも濃度に依存してカルバコール (0.3 μ M) 収縮を抑制したが, その効力はザプリナスト (5 型) > ビンボセチン (1 型) > EHNA (2 型) > Ro20-1724 (4 型) > ミルリノン (3 型) の順に大きかった. ビンボセチンおよび Ro20-1724 は濃度に依存して組織内 cAMP 含量を増加し, ビンボセチンおよび Ro20-1724 による弛緩と cAMP 含量の増加には高い相関が認められた. 一方, EHNA およびザプリナストは濃度に依存して組織内 cGMP 含量を増加し, EHNA およびザプリナストによる弛緩と cGMP 含量の増加には高い相関が認められた.

以上の結果から, モルモット盲腸紐においては PDE5 型阻害剤が最も強く収縮を抑制することが示され, また, ビンボセチンおよび Ro20-1724 による弛緩には cAMP が, EHNA およびザプリナストによる弛緩には cGMP が関連していることが示唆された.

36. モルモット胃輪走平滑筋における自発活動の頻度に及ぼすプロテインキナーゼ C 抑制薬の効果

名古屋市立大学・医・細胞機能制御学

中村 江里, 鈴木 光

モルモット胃体部から摘出した輪走平滑筋の小組織標本を用いて, 微小電極による細胞内電位の測定と筋束の等尺性張力測定により, 静止膜電位を変化させない範囲の濃度 (0.1~1 μ M) の chelerythrine (Chel) や bisindolylmaleimide I (BIM) などのプロテインキナーゼ C (PKC) 抑制薬や 2-aminoethoxy diphenylborate (2-APB) などの IP_3 受容体抑制薬の効果から, 自発活動におけるプロテインキナーゼ C (PKC) や IP_3 の関与について調べた. これらの筋は律動的な自発活動 (膜の緩やかな脱分極電位, slow potential, と収縮の発生) をしており, その発生頻度や振幅を指標にした. 筋は毎分 0.5~3 回で自発活動しており, Chel や BIM はその頻度を低下させたが, 2-APB は頻度を変化させなかった. そこで, 自発活動発生には主に PKC 活性が関与しており, IP_3 産生の変化は直接関与していないと考えられた. アセチルコリン (ACh, 50~100 nM) は膜電位をほとんど変化させなかった (0~5 mV) が, 自発活動の頻度と脱分極電位の振幅を増加させ, これらの変化は収縮の頻度と張力の増大を伴っていた. Chel は ACh による自発活動の頻度増加作用を抑制したが, 振幅増大作用は抑制しなかった. 2-APB は ACh による振幅増大作用を抑制したが, 増加された頻度は著明に変化させなかった. これらの結果から, 胃体部輪走平滑筋の自発活動の頻度は PKC の活性により制御されており, 脱分極電位や収縮の振幅には IP_3 が主に関与していると考えられた.

37. Actions of Chloroquine on Isolated Smooth Muscle Contractions : In Vitro

Department of Pharmacology, Olabisi Onabanjo University & University of Ibadan Nigeria.

Peter I. Aziba and David T. Okpako

The effect of chloroquine (CQ) on the contractions of isolated guinea-pig ileum (GPI), rat stomach strip (RSS), and endothelium free rat aortic strip (RAS), were investigated using the Grass polygraph model 7D and a force transducer FT.03 for recording and measurement respectively. The effect of CQ on ach-induced contractions ranged from potentiation in low concentrations (10^{-12} M- 10^{-7} M) to inhibition at concentrations greater than ($>10^{-5}$ M) in all preparations. Varying the concentration of Ca^{2+} in the physiological salt solution (PSS), bathing the muscles, greatly affected the action of CQ. In zero-pss containing 0.5 mM EGTA, RSS and RAS residual contractions persisted, while the relaxant effect of CQ was more marked on Noradrenaline (NA), than potassium (k^+) induced contractions in RAS, this effect was unaffected by methylene blue (10^{-3} M). The possibility of the relaxant effect being due to K^+ channel opening was excluded. It is concluded in these studies (i) that there are two sites of actions of CQ in smooth muscle contractions, (ii) the effect of the CQ depends on muscle type, agonist used, and concentration of Ca^{2+} in the bathing fluid, (iii) these muscles exhibit contractions suggesting differences in sources of activator Ca^{2+} , (iv) the vascular relaxation by CQ in RAS may be unique since it does not show similarity of action compared to known Ca^{2+} channel blockers nor potassium channel openers.

38. 平滑筋受容体作動性 Ca チャネル分子 transient receptor potential (TRP) 蛋白質ホモログ TRPC6 の細胞外および細胞内 Ca^{2+} による制御機構

九州大学・医・生体情報薬理¹, 生理研・統合バイオサイエンス・生命環境²

史 娟¹, 井上 隆司¹, 森 泰生², 伊東 祐之¹

(目的) 平滑筋受容体作動性 Ca 透過型陽イオンチャネルの有力な候補分子である TRPC6 に対する, 細胞外および細胞内 Ca^{2+} による制御機構について検討した。(方法) TRPC6 およびその変異体・キメラを HEK293 細胞に強制発現し, パッチクランプ法による電流解析を行った。(結果) ナイスタチン穿孔法を用いて Ca 欠除液中で活性化 (100 μM carbachol 投与) した TRPC6 電流に細胞外から 1 mM Ca^{2+} を添加すると, 速やかな増強とそれにひき続く緩やかな抑制が見られた。このうち, 速やかな増強は, BAPTA (10 mM; 4 mM Ca^{2+} 添加) の細胞内灌流後も残存したので, 細胞外作用であると考えられた。細胞外 Ca^{2+} の効果は '逆釣鐘型' の濃度依存性を示した。すなわち, 0.1-3 mM に範囲では増強, 3 mM 以上では抑制であった。低濃度領域における細胞外 Ca^{2+} の増強効果は, TRPC6 の膜貫通領域を TRPC7 のそれと入れ替えると消失したので, イオン透過孔の細胞外開口部付近を介して生じていると考えられた。一方, inside-out 法を用いて記録した単一 TRPC6 電流は, nM 範囲の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) に対して僅かながら濃度依存的減少を示したが, μM 範囲の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に対しては, 開口時間延長を伴う濃度依存的増加を示した。これらの効果は calmidazolium (3 μM) 前投与によって消失し, カルモジュリン (1 μM) 添加によって回復した。また, TRPC6 の C 端配列を TRPC7 のそれと入れ替えることによって TRPC7 型の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依存性抑制に転じた。更に, Ca^{2+} 非感受型変異カルモジュリンの共発現や, TRPC6 の C 端の仮想的 CaM 結合部位の欠変異で消失し, これには電流活性化過程の抑制も伴った。以上より, 細胞内 Ca^{2+} は, CaM に依存して, 活性化された TRPC6 チャネルを増強するだけでなく, チャネル活性化過程そのものにも寄与していることが示唆された。

39. ラット大脳動脈における張力活性化型, 細胞内 Ca^{2+} 感受性, 非特異的陽イオンチャンネル

九州大学・医・生体情報薬理¹

Department of Pharmacology, College of Medicine, University of Vermont, USA²

森田 浩光^{1,2}, 本田 啓², 伊東 祐之¹, Mark T. Nelson², Joseph E. Brayden²

血管や膀胱などの内臓器を構成する平滑筋細胞において, 張力活性化型非特異的陽イオンチャンネルの報告があるが, その分子実体は未だ解明されていない. そこで, 我々はその実体を解明すべく, ラット大脳動脈より平滑筋細胞を単離し, パッチクランプ法を用い, 陰圧により活性化されるイオンチャンネルについて検討した. Cell-attached mode で, 単離したラット大脳動脈平滑筋に suction tube より 20mmHg 以上の陰圧を加えると, 20~25 pS の Na^+ 及び Cs^+ 透過性の陽イオン電流が活性化された. この張力感受性のイオンチャンネルは inside-out mode では活性化されなかった. しかし, 細胞内からの Ca^{2+} (>1 mM) の投与により同コンダクタンスの陽イオンチャンネルが活性化された. このチャンネルは, 細胞内からの Gd^{3+} (100 μM), DIDS (100 μM) の投与により完全に抑制されたが, La^{3+} (100 μM), ruthenium red (30 μM) または NPPB (50 μM) では抑制されなかった. また, 同様の非特異的陽イオンチャンネルが HEK293 細胞でも観察された. 非特異的陽イオンチャンネルの一つである TRP チャンネルには, 浸透圧感受性チャンネルを含む機械刺激感受性のチャンネルが含まれることから, 我々は RT-PCR 法を用い, 約 25 pS の TRP チャンネルを検索した. その結果, 細胞内 Ca^{2+} 感受性の TRPM4 チャンネルが両細胞に共通して発現していることが明らかになった. そこで, TRPM4B チャンネルを過剰発現し, その性質を調べると上記のチャンネルと類似した性質を有するチャンネルが活性化され, また, 未発現の HEK 細胞に比して開口確率の顕著な増加が観察された. これらの実験結果は, 大脳動脈平滑筋において TRPM4 が張力活性化型非特異的陽イオンチャンネルとして血管の筋緊張維持に重要な役割を果たしていることを強く示唆する.

40. モルモット回腸平滑筋のムスカリン作動性非選択的陽イオンチャンネルの活性化におけるホスホリパーゼ C の関与について

岐阜大学・農・獣医薬理

小森 成一, 岡本 寛之, 有馬 大輔, 海野 年弘, 松山 勇人

平滑筋には, 受容体アゴニストで活性化される非選択的陽イオンチャンネルが存在する. マウス胃やウサギ門脈では, ホスホリパーゼ C (PLC) あるいはその下流のジアシルグリセロール (DAG) が同イオンチャンネル電流 (Icat) の誘発に関与している, と示唆されている. 本研究では, モルモット回腸縦走筋のムスカリン作動性 Icat を対象に PLC および DAG の関与について検討した. Icat はカルバコール (CCh) で誘発し, パッチクランプ法を用いて記録した. 一部の実験では, Gq 蛋白質/PLC 系を介して発生することが知られている Ca^{2+} 活性化 K 電流を同アゴニストで誘発した. <結果> (1) PLC 阻害薬 (U73122) は, CCh 濃度-Icat 反応曲線の最大反応を濃度依存性に抑制し, その 50% 抑制濃度は 0.12 μM であった. この値は報告されている PLC 活性 50% 阻害濃度の約 1/10 であった. (2) 同阻害薬は, GTP γ S により受容体非依存性に誘発した Icat も著しく抑制した. (3) U73122 の不活性型類似体 (U73343) は CCh 濃度-Icat 反応曲線の最大反応を抑制しなかった. (4) DAG の膜透過型類似体である OAG は, それ自身で Icat を誘発せず, また, CCh 誘発 Icat に有意な影響を与えなかった. (5) PLC 阻害薬は Ca^{2+} 活性化 K 電流を濃度依存性に抑制し, 50% 抑制濃度は 1.2 μM であった. この値は PLC 活性 50% 阻害濃度に近似していた. 不活性型類似体は同電流を抑制しなかった.

以上の結果は, ムスカリン作動性 Icat の活性化には PLC が関与していることを示唆する. しかし, その下流の DAG は関与していないものと考えられる. また, Icat の活性化に関与する PLC は Gq 蛋白質とリンクしている PLC とは異なる可能性がある.

41. ヒト、ブタおよびモルモット膀胱平滑筋における電気生理学的性質の比較検討

オックスフォード大学・薬理学¹, 名古屋市立大学・医・第1生理学²

橋谷 光¹, アリソン プレーディング², 鈴木 光¹

細胞内電位記録法を用いて、ヒト、ブタおよびモルモット膀胱平滑筋の電気生理学的性質を比較検討した。静止膜電位はヒト、ブタおよびモルモットとも約-50 から-40 mV で種による差は認めなかったが、モルモットでは連続した単発の活動電位が主に発生するのに対してヒトおよびブタではバースト状の活動電位が記録された。また活動電位の頻度、振幅、時間経過ともヒトおよびブタにおいてモルモットに比べ有意に低かった。モルモット膀胱ではカリブドトキシンで活動電位の再分極相および後過分極が抑制され、アパミンは活動電位の形状を変えなかったがバースト状の活動電位を誘発した。ヒトおよびブタ膀胱ではカリブドトキシンは再分極相のみ抑制し、アパミンにより早い後過分極が抑制された。またバーストに引き続いて起こる遅発性後過分極は4アミノピリジンにより抑制された。経壁神経刺激によりモルモット膀胱ではプリン作動性の興奮性接合部電位が発生し活動電位を誘発したが、ヒト膀胱ではコリン作動性の一過性過分極に引き続き持続性の脱分極が起こり活動電位を誘発した。一過性過分極はアパミンで抑制されたがカリブドトキシンでは抑制されなかった。ブタ膀胱ではプリン作動性の興奮性接合部電位を抑制した後にコリン作動性のアパミンで抑制される一過性過分極とそれに続く持続性脱分極が見られた。以上の結果から、モルモット膀胱平滑筋では大コンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャンネルが活動電位の制御に主要な役割を果たしているのに対して、ヒト及びブタでは小コンダクタンスカルシウム感受性カリウムチャンネルと電位依存性カリウムチャンネルの関与が大きいと考えられた。

42. ブタ尿道平滑筋 ATP 感受性 K⁺ チャンネルにおいてスルフォニルウレア受容体 1 (SUR1) とスルフォニルウレア受容体 2B (SUR2B) が機能的発現している

九州大学・医・泌尿器科¹, 同・医・生体情報薬理², 日本学術振興会特別研究員³

柚木 貴和^{1,3}, 寺本 憲功², 伊東 祐之², 内藤 誠二¹

SUR サブタイプによって作用が異なる K_{ATP} チャンネル開口薬 (Pinacidil, Diazoxide) 及び阻害薬 (Gliclazide, Tolbutamide) のブタ近位尿道平滑筋における K_{ATP} 電流におよぼす薬理作用をパッチクランプ法を用いて検討し、さらに RT-PCR 法を用いて SUR サブタイプごとの mRNA の発現を調べ、ブタ近位尿道平滑筋 ATP 感受性 K⁺ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) において機能的に発現しているスルフォニルウレア受容体 (SUR) のサブタイプを同定した。

ナイスタチン穿孔ホールセル電位固定法を用い保持電位が-50 mV の時、K_{ATP} チャンネル開口薬 Pinacidil (3-300 μM) および Diazoxide (100-500 μM) を投与すると濃度依存的に内向き整流性 K⁺ 電流が惹起された。Diazoxide 500 μM 投与によって惹起される内向き電流の最大振幅値は Pinacidil 100 μM によって惹起される最大振幅値と比較し約 40% であった。ほぼ同程度の活性化作用を示す Diazoxide 500 μM と Pinacidil 10 μM 投与によって惹起される内向き膜電流それぞれに対してスルフォニルウレア剤 (Gliclazide, Tolbutamide) を追加投与すると Diazoxide 500 μM 惹起性内向き電流は SUR1 に選択性のある低濃度のスルフォニルウレア剤 (Gliclazide 1 μM, Tolbutamide 30 μM) の投与によって抑制されたが、Pinacidil 10 μM 惹起性内向き電流は低濃度のスルフォニルウレア剤によって抑制されなかった。また RT-PCR 法では SUR1, SUR2B の mRNA の発現が観察された。

以上の結果よりブタ尿道平滑筋の K_{ATP} チャンネルでは SUR2B の他に SUR1 も機能的に発現していることが示唆された。

43. ジヒドロピリジン化合物による早期不活性化 K⁺ チャネル活性の抑制

名古屋市立大学・薬・細胞分子薬効解析¹, カルガリー大学・医・生理²

波多野紀行¹, 大矢 進¹, 村木 克彦¹, Wayne R. Giles², 今泉 祐治¹

早期不活性化 K⁺ 電流は神経や筋細胞において活動電位制御に重要な役割を果たしており, 平滑筋細胞では門脈, 結腸, 輸精管, 尿管等において観察される. 我々の研究室では, これまでモルモットやラットの輸精管平滑筋においてジヒドロピリジン (DHP) 化合物であるニカルジピンが早期不活性化 K⁺ 電流を抑制すること (IC₅₀ ≈ 1 μM), 電位依存性 K⁺ チャネルサブタイプのうち Kv4.3L が主にこの早期不活性化 K⁺ 電流に寄与しており, カルモジュリン様 Ca²⁺ 結合タンパク質スーパーファミリーである KChIP が Kv4.3L の細胞膜移行, 電流特性の制御に重要な役割を果たすことを見出してきた. 本研究では, HEK293 細胞発現系を用いてジヒドロピリジン化合物による Kv4.3L 及び Kv4.3L/KChIP 電流抑制作用についてホールセルクランプ法を用いて検討した.

DHP 系 Ca²⁺ チャネル阻害薬ニカルジピン投与により, 濃度依存的に Kv4.3L 電流は抑制され (IC₅₀ = 0.4 μM), 不活性化速度が加速した. 同様に DHP 系 Ca²⁺ チャネル活性化薬であり Bay K 8644 も同様の作用を示した. また, ニカルジピン投与により Kv4.3L 電流の不活性化からの回復速度は顕著に遅延した. さらに, Kv1.4, Kv4.2, Kv4.3L/KChIP2S 電流に対するニカルジピンの作用についても検討したが, Kv4.3L 電流に対する作用とほぼ同様であった. 以上の結果より, 心筋だけでなく平滑筋においても DHP 系 Ca²⁺ チャネル阻害薬は早期不活性化 K⁺ チャネル抑制作用を示し, それにより L 型 Ca²⁺ チャネル抑制による活動電位発生 (頻度) 抑制や Ca²⁺ 流入の減少を一部補償する可能性がある.

44. 電位依存性 Ca²⁺ チャネル β3 サブユニット欠損による膀胱平滑筋興奮時の細胞内 Ca²⁺ 動態変化の解析

名古屋市立大学・薬・細胞分子薬効解析¹, 秋田大学・医・薬理², 東北大学・医・分子薬理³

森村 浩三¹, 山村 寿男¹, 村上 学², 大矢 進¹, 村木 克彦¹, 布木 和夫³
柳澤 輝行³, 今泉 祐治¹

電位依存性 Ca²⁺ チャネル (VDCC) から流入する Ca²⁺ によって Ca²⁺ シグナルが増幅される Ca²⁺ 誘発性 Ca²⁺ 遊離機構 (CICR) は平滑筋でも報告されており, 活動電位発生時の興奮収縮連関に極めて重要である. 特に興奮性の高い膀胱平滑筋では活動電位発生時及び脱分極時に細胞膜近傍の局所部位で細胞全体の Ca²⁺ 濃度上昇に先行した急激な Ca²⁺ 濃度上昇が観察され (“Ca²⁺ ホットスポット”), これが他の部位に伝播して細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇をもたらす事を既にモルモット膀胱において報告している. これは局所的な CICR であり, 平滑筋の興奮収縮連関の起点として脱分極時の細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇に関与すると考えられる. 一方, VDCC の修飾タンパクである β サブユニットはチャネルの発現促進・活性増大に関与しており, 平滑筋で特に高発現している β3 サブユニットを欠損させたマウス (β3^{-/-}) では膀胱平滑筋の VDCC 電流が減少する事を以前に報告している. そこで本研究では β3 サブユニット欠損が細胞内 Ca²⁺ 動態に与える影響をホールセルパッチクランプ法と高速走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いた Ca²⁺ 画像解析により検討した. はじめに野生型マウス (wt) 膀胱平滑筋細胞でもモルモットと同様に脱分極刺激で発生する Ca²⁺ ホットスポットを観察し, その発生数が刺激時間の延長 (3~15 ms) に応じて増大する事を見出した. また β3^{-/-} 細胞でも同様の Ca²⁺ ホットスポットを観察し, Ca²⁺ ホットスポット内の Ca²⁺ 濃度上昇及びその発生数が wt に比べ有意に減少する事を見出した. さらに同様の脱分極で活性化される Ca²⁺ 活性化 K⁺ チャネル電流も β3^{-/-} 細胞で減少する事を見出した. 以上の結果は β3 サブユニット欠損で膀胱平滑筋の CICR が減弱した事を示しており, β3^{-/-} 膀胱平滑筋では脱分極時の興奮収縮連関が減弱する可能性が示唆された.

45. マウス門脈平滑筋に発現する KCNQ チャネルの同定と機能解析

名古屋市立大学・薬・細胞分子薬効解析¹, ネバグ大・医・生理², 聖ジョージ大学病院・医・薬理³

大矢 進^{1,2}, Gerard Sergeant², Iain Greenwood³, Burton Horowitz²

KCNQ チャネルは不整脈、癲癇等の重篤なイオンチャネル疾患に関与する電位依存性 K⁺ チャネルであり、KCNE と複合体を形成し、活動電位発生の調節に重要な役割を果たしている。本研究では門脈平滑筋において観察される自発性収縮に対する KCNQ 及び KCNE の寄与を検討するために、マウス門脈単離平滑筋細胞に発現する KCNQ, KCNE 遺伝子サブタイプを同定した。また、パッチクランプ法を用いて KCNQ チャネル一過性発現 HEK293 細胞と門脈単離平滑筋細胞の電気生理学的特性を比較検討した。

定量的 PCR 及び免疫細胞染色の結果、それぞれ 5 つの KCNQ (KCNQ1-5) 及び KCNE (KCNE1-5) のうち、門脈平滑筋において KCNQ1 及び KCNE3 が発現していた。また、シークエンス解析の結果、KCNQ1 の新規プライスバリエーション、KCNQ1b を単離した。KCNQ1b は心筋型 KCNQ1a exon 12-15 の欠損によりフレームシフトした細胞内 C 末端が 63 残基短いアイソフォームであり、脳、心筋、肺動脈には発現していなかった。また、two-hybrid 実験により KCNQ1b は KCNE3 と相互作用することが示された。さらに、KCNQ1b 電流は KCNQ1a 電流や門脈平滑筋細胞における遅延整流性 K⁺ 電流電流と同様に linopirdine 感受性であり、門脈平滑筋細胞における活動電位幅は linopirdine 投与により有意に延長した。したがって、マウス門脈平滑筋では KCNQ1 が遅延整流性 K⁺ 電流に寄与していることが示された。