

招待講演

ENDOTHELIUM-DERIVED HYPERPOLARIZING FACTOR(S): The search for the putative mediator and its role in vascular smooth muscle function.

Smooth Muscle Research Group, Faculty of Medicine, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N1

Christopher R. Triggle and Hong Ding

Although it is well established that endothelial cells can produce nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂) and, thus, regular vascular tone and blood flow, the existence, role and identity of the putative non-NO/PGI₂ endothelium-derived hyperpolarizing factor, or EDHF, remains controversial. Several candidate molecules/processes have been offered to explain the EDHF phenomenon: an epoxyeicosatrienoic acid (EET), an endogenous cannabinoid (anandamide), a small increase in extracellular potassium, myoendothelial gap junctions and/or an unknown chemical mediator. Studies in our laboratory utilizing resistance and conduit vessels from a variety of species (guinea pig, mouse, rabbit and rat) suggest that EDHF is unlikely to be just one substance. Data from the rabbit carotid artery suggest the role of an EET, whereas in mouse, rabbit, and rat mesenteric resistance arteries, our data suggest that EDHF is not an EET. Furthermore, in the study of vessels of both control and eNOS knockout mice, we provide conclusive evidence for the existence of a non-NO/PGI₂ mediator, whose production is upregulated in the absence of eNOS expression. Thus, in mouse mesenteric vessels, K⁺ and ACh-mediated relaxation share some common properties, however, in saphenous arteries from eNOS knockout mice, the effects of EDHF are not mimicked by a small increase in extracellular K⁺. Comparative studies of vessels from different mouse vascular beds also support our hypothesis that there is more than one EDHF.

Supported by the Medical Research Council of Canada.

特別講演

内皮による血管の制御

東京大学農学生命科学研究科

唐木 英明

生命の進化の過程で、循環系ができたのは後生動物（多細胞生物）が成立した後である。多細胞生物の中でもっとも単純な海綿動物では組織や器官がほとんど分化していないが、刺胞動物になると運動のための筋組織（平滑筋）が分化する。循環系を持つ最初の動物は紐形動物で、閉鎖血管系であるが心臓がなく、血管壁の弁で血液を動かす。軟体動物は開放血管系と2心耳1心室の心臓をもつが、血管には内皮細胞も平滑筋もなく、血液は凝固系も赤血球も持たず、リンパ系との区別もない。環形動物は閉鎖血管系をもち、血液凝固系も完成し、血管内皮細胞と一部平滑筋がある血管を持つ。他方、節足動物は他の動物とはかなり違った形の心臓と、開放血管系を持つ。血管系とリンパ系が分離して、完全な循環系が完成したのは脊椎動物になってからである。このように平滑筋に比べて内皮細胞は比較的新しく進化した組織であり、その役割は血管新生、血液凝固、平滑筋収縮、平滑筋および内皮細胞自身の増殖などの制御、すなわち閉鎖血管系の機能と構造の維持である。多くの情報伝達物質がこのような内皮細胞の機能を担っているが、なかでも一酸化窒素（NO）の役割が大きい。NOは節足動物であるカブトガニや植物細胞でも機能しているが、おそらく細胞障害性の物質であったものが進化の過程で情報伝達に利用されようになったのであろう。このような歴史を考慮しつつ、NOを中心にして内皮細胞による血管の制御について考えてみたい。

教育講演

薬用植物由来の新しいタイプのヒスタミンおよびセロトニン受容体拮抗薬の薬理的性質

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学教室

大泉 康

ヒスタミン、セロトニンなどの生理活性物質は、生体内で重要な生理的役割を果たしており、またアレルギー疾患、消化性潰瘍などの病気に深く関わっているため、これらの受容体拮抗薬は、生体生理機構の解明のツールとしてだけでなく、治療薬としても有用である。演者らは、抗炎症薬として薬用に供されているマンゴスチンの果皮からヒスタミンおよびセロトニン拮抗作用を示す α -マンゴスチンおよび γ -マンゴスチンをそれぞれ単離することに成功した。この両化合物は、分子内に窒素原子を含んでいない点、従来のヒスタミンあるいはセロトニンの受容体拮抗薬とは大きく異なる点が注目される。摘出ウサギ大動脈および摘出モルモット気管において、 α -マンゴスチンはヒスタミン H_1 受容体を介したヒスタミンの収縮反応を競合的に抑制したが、他のアゴニストによる収縮反応には影響を与えなかった。また、 α -マンゴスチンは、 3H -メピレミンの大動脈平滑筋細胞への結合を競合的に阻害した。 α -マンゴスチンの中枢神経系に対する作用を検討した結果、強い侵害刺激抑制作用が認められる用量において睡眠増強作用を起こさないことが明らかとなった。一方、 γ -マンゴスチンは各種アゴニストによる大動脈の収縮反応に影響を与えずに、 $5HT_{2A}$ 受容体を介したセロトニンの収縮反応を競合的に抑制し、またウサギ血小板において $5HT_{2A}$ 受容体を介したセロトニンの凝集反応を阻害した。以上の結果から、 α -マンゴスチンおよび γ -マンゴスチンはヒスタミン H_1 受容体および $5HT_{2A}$ 受容体のそれぞれの新しいタイプの拮抗薬であることが明らかになった。両化合物の化学構造の違いは、キサントン骨格の 7 位の水酸基にメチル基が存在するか否かだけであるが、それによってヒスタミン受容体拮抗薬からセロトニン受容体拮抗薬に変るといふ点も興味深いので、その類似化合物を合成して構造活性相関について検討した結果についても述べる。

依頼演題R-1

平滑筋細胞でのCaスパークと興奮収縮連関

名古屋市立大学 薬学部 薬物治療学教室¹・薬品作用学教室²

今泉祐治、大井義明、山村寿男、村木克彦、渡辺稔

心筋においてCa²⁺によるCa²⁺遊離(CICR)の最小単位として発見されたCaスパークは、興奮収縮連関の中心的Ca動態を担う現象として、詳細にその性質と機能が解析されてきた。一方、平滑筋のCaスパークについては、近傍の細胞膜上に存在するCa依存性イオンチャネルの活性化を介して膜電位変化を生じさせる機能が強調されている。1980年代中ごろから様々な平滑筋細胞において発見され、静止膜電位への寄与などが示唆されてきた自発性一過性外向き電流(STOCs)は、局所細胞内Ca貯蔵部位からのCa遊離と再充填の繰り返しにより、近傍の大コンダクタンスCa依存性Kチャネルが数十個単位で活性化されて生じると推論されてきた。Caスパークとしての局所Ca遊離の画像とSTOCsの同時記録は、この推論に明確な根拠を与えた。すなわち、Caスパークが細胞膜から離れた位置で生じる場合は、同期したSTOCが観察されないことから、細胞膜と非常に緊密な位置関係にある筋小胞体だけがSTOCを生じさせ得る。このような特定のCa貯蔵部位の数は1細胞内で比較的少数と推定され(＜10)、同一部位で繰り返しCaスパークとSTOCsが発生することなどが明かとなった。生理活性物質などの刺激による脱分極がCa流入を増大させると、細胞膜直下でのCaスパーク発生は増加し、過分極と弛緩が生じるという負帰還が機能する可能性が考えられている。また、興奮性の高い平滑筋細胞において、静止時にCaスパークを生じる部位は、活動電位発生時には[Ca²⁺]_i上昇の起点となってBKチャネルを強く活性化し、活動電位再分極相と過分極性後電位を担う。その[Ca²⁺]_i上昇は細胞全体に伝播することにより始めて収縮を引き起こし、興奮収縮連関が完結する。従って、平滑筋において細胞膜直下の筋小胞体の一部は、CICRにより局所Ca動態に重要な生理的役割を持つ。BKチャネル活性を制御することにより、静止膜電位の調節、活動電位の波形や発生頻度の制御を行うとともに、興奮収縮連関でのCa遊離連鎖の起点となる可能性が高い。

依頼演題R-2

平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動態の *in situ* 解析

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室
飯野正光

平滑筋の収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度によって制御され、低分子量G蛋白質を介するミオシン軽鎖リソ酸化効率の調節によってモジュレートされている。更に Ca^{2+} 濃度上昇には、細胞外からの Ca^{2+} 流入と共に、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出も関与している。このような複雑な収縮制御システムを正しく理解するには、生体内に近い条件で平滑筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を個々の細胞で測定することが重要と考えられる。そこで、我々は摘出動脈組織標本を用い、細胞間の相互作用が維持された状態で細胞内 Ca^{2+} イメージングを行ってきた。その結果、意外な事実が判明してきた。第一に、動脈壁の平滑筋細胞は、交感神経刺激に対して個々に独立に Ca^{2+} オシレーションを発生していることが明らかになった。これは、平滑筋細胞はシンチチウムを形成しているという従来の概念に一見反する。しかし、 Ca^{2+} オシレーション時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を詳しく解析すると、 Ca^{2+} 濃度上昇が細胞内を波状に伝播する Ca^{2+} ウェーブとなっており、イノシトール三リン酸(IP_3)による Ca^{2+} 濃度変化であることが判明した。 IP_3 による Ca^{2+} 動員は必ずしもギャップジャンクションを越えて広がることはないため、細胞ごとに独立した Ca^{2+} 濃度上昇の時間経過をとることができる。第二に、このような実験法を用いると、平滑筋細胞と隣接する内皮細胞の Ca^{2+} 濃度変化もほぼ同時に観測することができる。これにより、内皮細胞内でも Ca^{2+} オシレーションが生じ、一酸化窒素が生成されて平滑筋の Ca^{2+} オシレーション頻度を低下させることが明らかになった。第三に、外来刺激の全く無い状況でも、平滑筋細胞に振幅の小さな Ca^{2+} オシレーション (Ca^{2+} リプル) が見られ、局所レニン・アンジオテンシン系による Ca^{2+} 動員であることが示唆されている。このように、組織内 Ca^{2+} イメージングによって平滑筋細胞内 Ca^{2+} 動態を生体内に近い条件で理解できるようになってきている。

シンポジウム

ランチオンセミナー

SI-1. 平滑筋収縮蛋白質レベルでの制御機構：
細胞から分子レベルへのアプローチ
三菱化学生命科学研究所¹、明治薬科大学薬理²
石田行知¹、内田幸宏²

平滑筋を構成する分子種は骨格筋の分子種とは合同ではないことがこれまでの研究で明らかにされてきた。むしろ、平滑筋は非筋細胞に属し、平滑筋型の筋収縮蛋白質を多量に発現させ、非筋細胞の代謝・分泌・増殖などの機能に収縮能を合わせ持つように分化したと考えられる。一般に、平滑筋組織は、複数のタイプの細胞からなる機能適合胞体を形成し、生体における発現部位の機能に応じて多種類になっている。それに伴い、平滑筋細胞の機能的分化の程度や受容体などを介するシグナル伝達系も多様で複雑になっているようにも思われる。

平滑筋の収縮機構は、ミオシン軽鎖リン酸化を軸に収縮機構が論じられているが、平滑筋に特徴的な収縮の持続相はそのリン酸化と相関しないことが当初から指摘されていた。ミオシン軽鎖リン酸化の意義とそれを修飾するシグナル伝達系の解明は、カルポニン、カルデスモンなど日本人研究者の発見した蛋白質の役割を含め、未だ不明な部分が多い。収縮機構の分子的解明の活路を開くには、複雑に絡み合った収縮系を細胞レベルや分子レベルで解きほぐしたり再び構築したりする系での研究が必須であろう。そのような観点をふまえ、このシンポジウムでは、新しい培養系での平滑筋収縮機構の分子的アプローチ法、分子生物学的手法の応用、新しいシグナル伝達系などについて論議し、収縮機構の本質的解明に繋がる契機となることを期待する。また、ミオシン軽鎖は非筋細胞系での役割も明らかになりつつある。平滑筋収縮能の研究から一般細胞機能を看破し、その成果が今までと同様に他分野の研究者を驚かすことに発展することを期待する。

[資料] ① Somlyo, A.P. (1999). Kinases, myosin phosphatase and Rho proteins: curiouser and curiouser. *J. Physiol. (Lond.)* **516**: 630. ② Sanders, L.C., et al. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**: 2083. ③ Special issue on signal transduction in smooth muscle. (1999) ed. R.A. Murphy. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* vol. **134**. ④ Special issue on smooth muscle contraction. (1998). *Acta Physiol. Scand.* **164** (4).

SI-2. シグナルトランスダクション研究のための新しい人工平滑筋組織：三次元培養系で再構成した平滑筋組織標本での刺激-収縮連関
明治薬科大学薬理学教室
大石 一彦、内田 幸宏

平滑筋組織は複数のタイプの平滑筋細胞と細胞外間隙にある特有の細胞外基質よりなり、機能的な合胞性を備えている。平滑筋の刺激-収縮連関に関する研究のほとんどは摘出標本を用いて行われてきた。平滑筋組織より得られたこれらの結果は、平滑筋細胞それ自身の性質というよりは機能的合胞体としての複数のタイプの平滑筋細胞からなる組織体が引き起こした結果を反映している。したがって、平滑筋細胞の収縮制御機構を調べるにあたって、平滑筋組織より単離培養した平滑筋細胞を用いて検討することはきわめて有効な手段の一つであるが、培養した後の細胞はしばしば収縮反応性を失ってしまうことが有るため、培養平滑筋細胞を用いた検討には限界があった。

培養平滑筋細胞をコラーゲンゲルに包埋すると、細胞自身の牽引力のため時間とともに自発的に縮むことが知られている。この自発的な収縮を物理的に制限して機械的な緊張を負荷すると、ゲル中の平滑筋細胞は分化型フェノタイプの特徴である細長い紡錘形に変化し、引っ張りの方向に対して並行に配向する。我々は、このことを発展させることで、典型的な収縮性アゴニストに対して等尺性の収縮を発生する平滑筋組織標本を再構成する方法を確立した。この標本は、 α アドレナリン受容体作動薬やセロトニンなどの収縮性アゴニストに対して感受性を示し、用量依存性に等尺性の収縮張力を発生した。この方法を用いることにより、特定のタイプの平滑筋細胞を用いて収縮反応性を定量的に測定することが可能であり、また、遺伝子工学的操作を施すことが容易であることから、平滑筋組織や単離平滑筋細胞では見い出せなかった収縮機構の分子的解析に大変有用である。そこで本シンポジウムでは、この平滑筋組織標本に再構築された収縮反応性の特徴を示すとともに、収縮制御機構の分子的解析への応用の可能性を考察する。

SI-3. 三次元培養系で再構成した平滑筋組織標本における収縮蛋白質の発現と収縮性機能

1東京大学大学院医学系研究科薬理学教室、2明治薬科大学薬理学教室
大室 弘美¹、大石 一彦²、内田 幸宏²

平滑筋組織より単離培養した平滑筋細胞の収縮性を定量的に測定する系の確立は、平滑筋の収縮制御機構の分子的解析や平滑筋の分化制御の研究において重要な意義を持つ。我々は、コラーゲンゲルにモルモット胃底部由来の培養平滑筋細胞を包埋して、機械的な緊張を負荷することで、典型的な収縮性アゴニストに対して収縮張力を発生する紐状の平滑筋組織標本を再構成する方法を確立した。この標本は、セロトニンやノルエピネフリンなどの収縮性アゴニストに反応して用量依存性に等尺性収縮を発生する。しかしその一方で、発生張力が摘出平滑筋組織よりも小さく、またアセチルコリンに対する感受性が欠如しているなど胃底部組織本来の収縮反応性とは異なる性質も兼ね備えている。

一般に、平滑筋細胞は培養に供すると容易にその収縮型フェノタイプを脱分化型に変換することが知られている。イムノプロット法により平滑筋組織標本を構成する収縮蛋白質の発現を検討したところ、収縮蛋白質については脱分化型に類似する一方で、収縮型フェノタイプの特徴である平滑筋 α -アクチンやカルポニンの発現が観察された。したがって、この平滑筋組織標本は部分的に平滑筋様の収縮性機能を獲得しているものの、機械的緊張の負荷だけでは平滑筋細胞の収縮型への形質転換が不十分であることが考えられる。そこで、様々なサイトカインの収縮反応性と収縮蛋白質の発現に対する変化について検討したところ、TGF- β 1が、平滑筋組織標本の再構築を促進したりカルポニンやh-カルデスモンの発現を高めたりすることで、収縮反応性を増大することを見出した。

以上のことよりTGF- β 1は平滑筋の収縮機能の獲得過程における重要な因子の一つであるとともに、この平滑筋組織標本を用いることにより、平滑筋分化因子の探索や分化制御に絡めた収縮性機能の分子的解析が可能であることが示唆された。

SI-4. 平滑筋収縮とカルポニン : カルポニン遺伝子欠損マウスを用いた検討

東京大学大学院農学生命科学研究科、神戸大学理学部¹、大阪成人病センター²
尾崎 博、唐木英明、土屋禎三¹、高橋克仁²

カルポニンはニワトリ筋胃より単離、精製されたアクチン結合タンパク質である。その後、哺乳類から3種類のカルポニンがクローニングされ、それぞれの等電点よりbasic (h1)、neutral(h2)、acidicカルポニンに分類されている。この中でbasicカルポニンは平滑筋にほぼ特異的に発現が認められ、*in vitro*でアクチン活性化ミオシンATPaseを抑制すること、また細胞内でthin filament上に存在することから、平滑筋収縮において何らかの役割を担っていると考えられている。basicカルポニン遺伝子欠損マウスを用いた最近の研究では次のような成績が報告されている。すなわち、1) 輸精管を用いlength-tension関係を求めると、CP+/+マウス、CP-/-マウスの両方で違いは認められなかった。CP+/+マウス、CP-/-を等張性140mM KCl溶液で刺激すると、立ち上がりの速い収縮 (peak収縮)を発生した後、静止張力よりわずかに高い持続性収縮を発生した。2) Peak収縮時におけるforce-velocity関係をisotonic quick release法で求めると、unloaded shortening velocity がCP-/-マウスで有意に大きかった。3) 抗ミオシン抗体と尿素/グリセロールPAGEを用いたウェスタンブロット法で20KDaミオシン軽鎖のリン酸化量を測定したところ、静止状態、140mM KCl刺激後8秒、15分後において、CP+/+マウスおよびCP-/-マウス間でミオシンリン酸化量に違いは認められなかった。4) 胸部大動脈を用い等張性72.7mM KCl溶液で標本を刺激するとCP+/+マウス、CP-/-とも持続性の収縮を発生した。5) KCl収縮後5分後にisometric quick releaseを行うと収縮の回復はCP-/-マウスのほうがCP+/+マウスより速かった。また、静止状態、72.7mM KCl収縮後30秒、20分後におけるリン酸化ミオシン量はCP+/+マウス、CP-/-マウス間で違いは認められなかった。以上の結果より、平滑筋収縮においてbasicカルポニンにはクロスブリッジの回転を抑制する機能を担うこと、その抑制機構はミオシンのリン酸化によらないアクチン活性化ミオシンATPaseの抑制によると考えられる。この様な知見を中心として、本シンポジウムでは、最近新たに明らかになったカルポニンの機能全般についても概説したい。

SI-5. 平滑筋収縮におけるROCK (Rho-キナーゼ) の役割
 ー選択的阻害薬 Y-27632 を用いてー
 吉富製薬 (株) 創薬研究所
 上畑 雅義

平滑筋の収縮はカルシウム依存性収縮機構とカルシウム感受性機構により調節されていると考えられている。このうちカルシウム感受性機構についての詳細なメカニズムは依然不明であるが、近年、低分子量 G 蛋白質のひとつである Rho がカルシウム感受性機構に関与することや、Rho の活性化がミオシン軽鎖脱リン酸化酵素の阻害によりミオシン軽鎖のリン酸化レベルを上昇させることなどが明らかになってきた。我々は血管平滑筋弛緩作用を有するピリジン誘導体、Y-27632 がカルシウム感受性機構に作用することを見出した。Y-27632 と結合するタンパク質を Photoaffinity Labeling の手法を用い単離したところ、その部分構造は Rho により活性化される protein kinase の一つである p160ROCK (ROCK-I) に含まれる構造と一致した。そこで、精製した p160ROCK を用いて Y-27632 をはじめとする一連の化合物について阻害作用を検討したところ、平滑筋弛緩作用と相関した p160ROCK 阻害作用が認められた。また、Y-27632 は p160ROCK の isoform である ROCK-II (Rho-キナーゼ) に対しても同様な阻害作用を示した。一方、Y-27632 の他の protein kinase (PKC, A-kinase, MLCK) に対する作用は 100 倍以上弱く、特にカルシウム依存性収縮機構において重要と考えられている MLCK に対してはほとんど阻害作用を示さなかった。これらの結果より、Y-27632 は ROCK を阻害することで平滑筋弛緩作用を示すことが明らかとなった。また、平滑筋収縮において、Rho/ROCK を介するカルシウム感受性機構が重要な役割を演じていることを示唆された。本シンポジウムでは、Y-27632 を用いた検討により判明した平滑筋収縮機構や平滑筋収縮が関与する病態における ROCK の役割を紹介したい。

SI-6. ミオシン軽鎖リン酸化と収縮反応の乖離

¹静岡県立大学薬学部薬理学教室、²三菱化学生命科学研究所
 小原一男¹、石田行知²、小出昌代¹、中山貢一¹

平滑筋の収縮に 20,000 ダルトンのミオシン軽鎖 (MLC₂₀) のリン酸化が重要な役割を演じていることが知られている。しかし、ラッチ状態に見られるように、MLC₂₀ のリン酸化がほぼ静止状態のレベルまで低下してもなお張力が維持されているという MLC₂₀ のリン酸化と張力との間に乖離が認められている。今回我々は MLC₂₀ のリン酸化レベルが高い状態に維持されているのも関わらず張力が減少 (弛緩) するというラッチ状態とは異なる MLC₂₀ のリン酸化と張力との間の乖離現象について検討した。

モルモット盲腸紐平滑筋において、40 mM KCl により張力と MLC₂₀ のリン酸化レベルが上昇した後一定のレベルを維持した。このとき 95% O₂ にかえて N₂ を外液に通気し hypoxia 状態にすると、張力はほぼ静止レベルまで低下したが、MLC₂₀ のリン酸化レベルはなお高い状態に維持された。一方、イヌ脳底動脈において 1mm/sec の速度で初期長の 50% の伸展刺激を加えると一過性の収縮が惹起され、1 分で最大に達した後自発性に弛緩して伸展 15 分後にはほぼ静止レベルまで減少した。また、伸展刺激により MLC₂₀ のリン酸化レベルは上昇し約 1 分で最大に達し、伸展 15 分後でもなおこの高いレベルを維持していた。伸展刺激による張力発生と伸展 1 分後の MLC₂₀ のリン酸化レベルの上昇は Ca²⁺ チャネルブロッカーのニカルジピン (100 nM) により抑制されたが、伸展 15 分後の MLC₂₀ のリン酸化レベルは薬物未処置のときの約 50% にまで上昇した。

以上の結果より、hypoxia による弛緩や、伸展誘発性収縮の自発性弛緩に MLC₂₀ のリン酸化が関与していない可能性が示唆された。

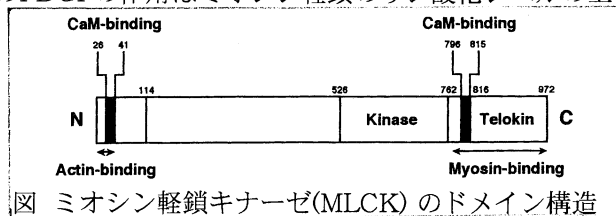
SI-7. ミオシン軽鎖キナーゼを欠損した血管平滑筋株の性質

群馬大学・医学部・薬理学教室
小浜 一弘

ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)はCa²⁺とカルモジュリン存在下でミオシン軽鎖をリン酸化し、アクチン・ミオシン相互作用を引起すものとして得られた。MLCKにはこのキナーゼ作用以外に、アクチン結合性及びミオシン結合性を担うドメインが明らかになり、いずれもアクチン・ミオシン相互作用を修飾する(1)。

一方、アクトミオシン系は血管平滑筋細胞で収縮のみならず多様な細胞運動性を担っているが、MLCKのいくつかの制御機能とどの様に関連しているか？まず、てはじめとして、血管平滑筋由来のSM3株(2)を用い、MLCK遺伝子・ターゲッティングを行った。この結果、MLCKの発現を欠損する stable transformant が得られた。この変異株では血小板由来成長因子(PDGF)が引起す membrane ruffling が欠損していた。この事実は細胞運動にMLCKが必須であることを明らかにするものである。

しかしながら、コントロール株でのPDGFの作用はミオシン軽鎖のリン酸化レベルの上昇を伴わなかった。またMLCKの阻害薬の作用も受けなかった。MLCKの作用様式につき、in vitro でみつかったMLCKの多機能性制御能と合せ、考察を加える。(1) Kishi et al. (1998); (2) Sasaki et al. J. Biochem. 106: 1009-1018 (1989)



SII-1. アドレナリン受容体の調節機構

東京大学大学院薬学系研究科薬効安全性学

黒瀬 等、川崎 亜希子、椎名 考子、長尾 拓

受容体の発現量や活性が、各種病態時に低下していることが報告されており、受容体調節の分子レベルでの機構解明が、病態時の受容体変化の理解のみならず、臨床への応用を可能にすると期待されている。 β アドレナリン受容体 (β 受容体) は3種のサブタイプ(β_1 、 β_2 、 β_3)よりなり、アゴニスト刺激による調節機構も異なっている。HEK293細胞に β_1 および β_2 受容体を発現させ、インターナリゼーション(受容体の細胞内小胞への移行)の違いを調べると、 β_2 受容体はアゴニスト刺激によりインターナライズされたのに対し、 β_1 受容体はインターナライズされなかった。しかし、インターナリゼーションに必要な β -アレスチンの受容体への結合は、アゴニスト刺激により増大した。また、 β_1 受容体のカルボキシル末端に β -アレスチンを付加させた融合タンパク質は、アゴニスト依存性にインターナライズした。従って、 β -アレスチンは β_1 受容体に結合するものの、インターナリゼーションの経路に入る前に解離する可能性が考えられた。次に、 β_1 受容体にインターナリゼーション抵抗性を与える部位を同定するため、 β_1 受容体と β_2 受容体のキメラ受容体を作製した。 β_1 受容体の第7細胞膜貫通領域以降を β_2 受容体の相同な部分と置き換えたキメラ受容体はインターナライズした。この結果は、インターナリゼーションに必要な部位は第7細胞膜貫通領域以降に存在する事を示唆しており、またこの領域に β -アレスチンとの結合部位が存在している可能性を推測させる。インターナリゼーションは受容体が脱リン酸化され細胞表面に戻る過程のみならず、受容体が細胞より消失するダウンレギュレーションの過程にも関与している。従って、 β_1 受容体のインターナリゼーション抵抗性は、 β_1 受容体が β_2 受容体と異なる経路で分解される可能性を示唆している。

SII-2. 交感神経 β 受容体の薬物結合様式：Molecular modelingによる解析

新潟薬科大学薬理学¹⁾、サントリー生物有機科学研究所²⁾
長友孝文¹⁾、大貫敏男¹⁾、石黒正路²⁾

交感神経 β 受容体 (β 受容体)の分子レベルでの研究は、分子生物学あるいはコンピュータの技術開発などによりその構造と機能的役割が解明されるようになり、さらにmolecular modeling(分子設計支援システム)の開発によりリガンド-レセプター間の三次元相互作用部位(結合部位)の解析(推定)も可能となってきた。そこで、この研究は、molecular modelingを用いて β 遮断薬(propranolol, bopindolol and its two metabolites)と β_1 、 β_2 、 β_3 -受容体サブタイプとの相互作用部位、結合様式および各サブタイプ間における相互作用様式の相違などを解析したので報告する。(方法)ヒト β_1 、 β_2 および β_3 -受容体の7回膜貫通型のヘリックス状のモデルは、DISCOVER/Insight II (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA)を用いて構築し、バクテリオロドプシンの構造をヒト β -受容体のモデル構造構築のための骨組みとして使用した。また、7回膜貫通型のアミノ酸配列は、Trumpp-Kallmeyerらによって報告されたものに従って定め、膜内外のヘリックス構造はレセプターの一次配列によって形成した。(結果)モデリングから、propranolol, bopindolol および2種類の代謝産物の結合可能部位は、各サブタイプの第3(H3)、第4、第5、第6ヘリックスであると推定された。また、propranolol 構造中のアミノ基とアルコール基は、Asp113(H3)と水素結合し、ナフチル基はTry109(H3), Val292(H6), Phe289(H6), His172(H4)残基と、また isopropyl 基は Ile112 (H3), Cys285(H6) および Pro288(H6) 残基と疎水結合することが推察された。さらに、 β 遮断薬と β_1 -および β_3 -受容体との相互作用部位は β_2 -受容体と同じ部位で相互作用(結合)するが、特に β_3 -受容体の場合は β 遮断薬との結合部位におけるアミノ酸残基の違いが β -受容体との三次元構造上相互作用に影響し、その結果親和性の差違に影響していることが推測できた。

SII-3. The contractile functions of resistance and conduit arteries in dog are characterized by different α_1 -adrenoceptor subtypes.

Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario L8N 3Z5, CANADA
Kwan C.Y.

For the past decade, using radioligand binding, contractility and immunohistochemical techniques, we have been characterizing the vascular smooth muscle (VSM) adrenoceptors (AR) in four functionally different canine blood vessels: dog aorta (DAO), dog mesenteric artery (DMA), dog mesenteric vein and dog saphenous vein. All four vessels elicited α_1 -AR contractile responses (antagonized by prazosin), but α_2 -AR responses (sensitive to rauwolscine), were found only in veins. This communication reviews the pharmacological characterization using α_1 -AR subtype-selective antagonists on the DMA, DAO and dog carotid artery (DCA). DAO contains mainly α_{1B} -AR (some α_{1D} -AR), DCA has mainly α_{1D} -AR (some α_{1B} -AR) and DMA elicits primarily $\alpha_{1A/1L}$ -AR. Literature survey shows that mesenteric arteries from many species and other resistance vessels all elicit α_{1A} -AR, whereas large elastic arteries from many species express functional $\alpha_{1B/1D}$ -ARs. It is interesting to note that DMA (α_{1A} -AR) is much more susceptible to agonist(phenylephrine)-induced desensitization than DAO and DCA ($\alpha_{1B/1D}$ -ARs). The higher susceptibility of α_{1A} -AR in DMA compared to DAO or DCA may be of physiological significance in the light of its high density of sympathetic innervation and the control of peripheral resistance. While the pharmacological significance of distinct difference in α_1 -AR subtypes in the resistance and conduit arteries remains obscure, the distinctly different α_1 -AR subtypes may be of therapeutic significance in cardiovascular diseases involving different vascular beds.

SII-4. α_1 アドレナリン受容体と逆作用薬 inverse agonist

福井医科大学薬理学教室

村松郁延, 朱 軍, 鈴木史子, 高氏留美子, 谷口隆信

従来, 受容体は agonist が結合してはじめて活性化される比較的静的なものと考えられてきた。しかし現在では, 受容体は不活性化と活性化の平衡状態をとる動的なものと考えられている (two state-receptor theory)。この場合, agonist は平衡を活性化方向に導き, antagonist は agonist に対する拮抗作用と, 平衡状態を不活性化方向に導く, いわゆる逆作用を示す。前者のみを示す antagonist を neutral antagonist, 後者の作用を併せもつ antagonist を inverse agonist と言い, 受容体が過剰発現したり持続的に活性化している病的状態などで異なった効力を発揮すると考えられている。

今回私達は, ヒト α_{1a} アドレナリン受容体の第3細胞内ループにアミノ酸変異 (271A1a/Thr) を導入して constitutive active mutant としての性質を解析するとともに, inverse agonist, neutral antagonist を検索した。変異受容体を発現した CHO 細胞を用いて IP_3 産生能を調べたところ, agonist を処置しなくても IP_3 産生能は持続的に上昇していた。この上昇は prazosin で抑制されたが, KMD-3213 は影響せず, むしろ prazosin の作用に拮抗した。prazosin などの antagonist を培養培地中に加えておくことにより, 変異型では著明な受容体密度の上昇 (upregulation) を引き起こした。これに対し, KMD-3213 は upregulation を惹起せず, prazosin による upregulation を抑制した。以上の結果等より, α_{1a} アドレナリン受容体の antagonist には prazosin のような inverse agonist と, KMD-3213 のような neutral antagonist が存在すること, 前者の解析には constitutive active mutant が有用であることが明らかとなった。

SII-5. 交感神経 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の細胞内局在と薬理作用

国立小児病院・小児医療研究センター・分子細胞薬理学研究部
辻本豪三、平澤明、許 昭俊

細胞膜に存在する G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) は、非常に大きな遺伝子ファミリーよりなり、細胞膜上のセンサーとして細胞外の様々な刺激を細胞内へ伝える働きを持つ蛋白質で、各種疾患治療上の重要な標的分子である。GPCR は、単純に信号を伝えるだけではなく、ダイナミックにその細胞内の局在を変えその情報伝達機能を調節することが明らかとなってきたが、その分子機構の解析は余りなされていない。この細胞生理学的役割を明確にすることは、膜蛋白の一般的な制御機構を知る上でも、また、新たな治療薬開発の標的を見いだす上でも非常に有意義と考えられる。我々は、交感神経 $\alpha 1$ アドレナリン受容体を G 蛋白質共役型受容体のモデルとして用い、受容体の細胞内での修飾とそれが受容体の動態に関して果たす役割について (1) “可視化生物学手法” による細胞内局在のモニタリングや定量化: $\alpha 1$ アドレナリン受容体サブタイプのペプチド抗体、蛍光標識リガンドや Green Fluorescent Protein (GFP) を用い、受容体蛋白の標識等の分子生物学手法や蛋白蛍光標識法を確立し、フローサイトメトリー及びレーザー共焦点顕微鏡にて、蛍光標識された受容体の細胞内局在変化を検出、定量を行っている。最近各 $\alpha 1$ アドレナリン受容体の細胞内局在がサブタイプにより異なること、更に、この細胞内局在の相違によりクロロエチルクロロニジンによる不活化感受性の違いが生じることを見出した。(2) 蛋白間相互作用検定法による受容体の細胞内局在調節因子の同定: 酵母ツーハイブリッドにより受容体蛋白の細胞膜表面への移送に必要な部位の決定、細胞内局在調節因子の同定に成功した。シンポジウムでは $\alpha 1$ アドレナリン受容体の細胞内局在の分子機構と薬物作用、平滑筋細胞における局在、細胞内局在調節因子について最近の知見を紹介する。

SII-6. 糖尿病モデル動物の平滑筋収縮反応と情報伝達系異常

昭和大学医療短期大学作業療法学科・生理学研究室
坂井 泰

Streptozotocin(STZ)誘発糖尿病ラットを用いて胃平滑筋における過収縮機構に PKC 活性増加が関与していることを我々は既に報告している。今回、STZ 誘発糖尿病ラットの胃平滑筋組織の PKC-isoforms の分布変動と DGkinase(DGK)の活性変動について検討した。

Western blotting の結果、胃幽門部平滑筋組織には 8 つの PKC isoforms(- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , - ζ , - ι , - λ)の存在が確認され、特に PKC- β は無刺激下における糖尿病標本から分離した核画分で対照群の約 1/2 に減少した。Carbachol 作用後 PKC- β は対照群では有意に減少したが、糖尿病群では有意な変化は観察されなかった。PKC- ϵ は無刺激下における糖尿病標本の細胞質画分で対照群の約 2.2 倍に増加したが、carbachol 作用後では両群とも有意な変化は観察されなかった。無刺激下における DGK 活性は糖尿病群で約 2 倍に増加したが staurosporine や R59022 前処置により完全に阻害された。Carbachol 作用後 DGK 活性は対照群で増加し糖尿病群と同程度を示したが、この増加は atropine および R59022 の前処置により完全に阻害された。糖尿病群では carbachol 作用後 DGK 活性に有意な変化は観察されなかった。Neomycin は両群における DGK 活性を抑制しなかったが、内因性 phosphatidic acid の産生を有意に抑制した。

DGK の活性変動は phosphatidylinositol-turnover の代謝回転速度を変動させ、さらに DG 量の変動を介して PKC 活性を制御している可能性があり、糖尿病群における PKC-isoforms 分布変動と DGK 活性の変動が胃平滑筋収縮異常に関与していることが推察された。

SII-7. 血管における病態シグナリングと遺伝子発現制御機構

三重大学医学部薬理学教室

田中利男、西村有平、角田宏、天野誉、中充子

低酸素暴露により、肺血管平滑筋細胞に増殖変化などの血管リモデリングを伴う肺高血圧症モデルラットを作成し、蛍光ディフアレンシャルディスプレイにより遺伝子発現プロフィールを解析した。その結果、解析した7665バンドのうち、低酸素暴露により遺伝子発現が上昇するものは275バンド(3.6%)、減少するものは108バンド(1.4%)認められた。これらのシーケンス解析により、我々が既に独自に分離精製、cDNAクローニングしている新しいカルシウム結合蛋白質S100Cが低酸素により発現誘導されることを見出した。さらに、心筋や血管平滑筋細胞において低酸素下でS100C mRNAおよびS100C蛋白質の発現上昇を明らかにした。そこでS100Cの遺伝子をクローニングし、その構造を解析した。その結果、特徴的なエクソン-イントロン構造を見出した。すなわち、最初のイントロンが開始コドン直後に存在することが明かとなった。この位置のイントロンは、他のS100蛋白質ファミリーには全く認められず、すべてのカルモデュリン遺伝子に存在することからカルモデュリンファミリーとの分子進化上の関係が示唆された。さらに、プロモーター領域に少なくとも二ヶ所の低酸素応答配列(hypoxia response element)を認めた。そこで、S100C遺伝子のプロモーター領域における低酸素応答配列の欠失変異株や位置指定変異株を構築し、それぞれのS100C遺伝子の低酸素依存性発現における役割を解析した。また低酸素性細胞傷害に対する保護作用が報告されているタウリンが、この低酸素によるS100C遺伝子発現を抑制することを見出した。さらにその作用点が転写レベルであることを明らかにした。また、S100C蛋白質に対しては、心筋梗塞治療薬の一つであるプロプラノロールが、作用することを見出した。一方、自家血の大槽内注入による脳血管攣縮モデルラット脳底動脈におけるHeme Oxygenase 1の役割についても、報告する。

SIII-1. 平滑筋の基礎と臨床—基礎研究から臨床応用—

司会 泌尿器科平滑筋：森田隆、吉田正貴（熊本大）
産婦人科平滑筋：瓦林達比古（福岡大）
内科（呼吸器科）平滑筋：相沢久道（国立療養所福岡東病院）

研究の成果は、応用されてはじめて達成されると考えています。私達の個人的な印象かも知れませんが、企業の研究室におられる方々が、その役割上、応用できる研究成果を目指しておられるのに対し、大学の研究室におられる方々は、研究成果の応用という点で、余り積極的でないように見受けられます。このような思いは、大学の基礎、臨床そして企業の研究者のみならず多科にわたる臨床医が属する日本平滑筋学会にあって、益々何とかなしなればいけないと思うようになりました。そこで、今後の日本平滑筋学会の方向性の一つを探る意味からも、平滑筋の基礎研究から臨床応用という本シンポジウムを企画いたしました。大学での研究、企業での研究、また、これから応用する研究だけでなく、すでに応用されている研究についても、その苦労話などを、会員全員が理解できるように、判りやすく、面白く披露して頂くことによって、会員が、おおいに勇気づけられることを目的としています。シンポジウムの一部にランチョンセミナーも含んでおりますので、食事などしながら、気楽にシンポジウムを楽しんでいただければ幸いです。

SIII-2. 下部尿路平滑筋においてアドレナリン性 β_3 受容体が担う機能

東京田辺製薬株式会社 かずさ研究所
飯塚 博之，岩田 俊也，尾坂 曜子，盛中泰洋

アドレナリン性 β_3 受容体は当初、げっ歯類の脂肪細胞、胃腸管平滑筋に存在し脂肪分解、熱産生、胃腸管運動抑制に関与することが報告された。ヒトにおいては褐色・白色脂肪細胞、胆嚢、小腸、結腸、胃、前立腺、心臓に存在することが報告されている。

これまで下部尿路におけるアドレナリン性 β 受容体については、 β 受容体を介して膀胱平滑筋が弛緩し蓄尿が促されることが知られ、この反応を担う β サブタイプとしては薬理的な証明により β_2 であることが想定されていた。

私達は下部尿路における β_3 受容体が担う機能を明らかにし β_3 作動薬 GS-332 (GS) の頻尿・尿失禁治療薬としての有効性を明らかにすることを目的として、GS のラット、ウサギ摘出膀胱弛緩作用の他、*in vivo* 麻酔ラット膀胱容量並びに排尿収縮、更に覚醒ラット下腹神経切断頻尿モデルに対する影響を検討した。

その結果 GS はラット摘出膀胱を弛緩させ、ウサギ摘出膀胱には作用しなかった。また *in vivo* 麻酔ラットの膀胱容量を増加させたが、排尿収縮に及ぼす影響は小さかった。GS は更に覚醒ラット下腹神経切断頻尿モデルに対して排尿回数を有意に減少させた。

以上の結果から下部尿路におけるアドレナリン性 β_3 受容体には種差が存在し、ラットにおいては β_3 受容体と共に膀胱平滑筋の弛緩反応を担い、蓄尿機能に寄与することが示唆された。ここで GS は排尿収縮に与える影響が小さかったことから、汎用されている頻尿・尿失禁治療薬である抗コリン剤と比較して残尿量を増加させない点で有用な頻尿・尿失禁治療薬となる可能性が期待された。

SIII-3. 女性ホルモンの下部尿路遠心性神経への作用

熊本大学医学部 泌尿器科学教室

稲留彰人、吉田正貴、米納 誠、瀬下博志、宮本 豊、村上滋孝、上田昭一

【目的】性ホルモンは下部尿路機能に様々な影響を及ぼすが、その作用機序は明らかではない。我々は家兔尿道、膀胱平滑筋において神経伝達物質の反応性と放出量に及ぼす女性ホルモンの影響を検討した。【方法】成熟雌家兔に対し卵巣摘除を行い、estradiol 0.1mg/kg/day (E群)、生食水 (Ox群) を2週間筋肉内投与した群および偽手術群 (C群) を作成し、3週後に尿道膀胱を摘出して平滑筋条片を作製した。これを筋浴槽内に固定して張力変化を記録し神経伝達物質に対する反応性を観察した。また臓器用透析プローブを平滑筋条片内に貫通させ、透析液を灌流しながら経壁電気刺激 (EFS) を行い microdialysis 法にて透析液を回収し、神経伝達物質の放出量を HPLC にて分析・測定した。【結果】尿道平滑筋では KCl、phenylephrine に対する収縮に各群間で有意差はなかったが、EFS による収縮、尿道からの norepinephrine の放出量は Ox 群で有意に低く、phenylephrine 前収縮後の EFS による弛緩反応、尿道からの nitric oxide (NO) 放出量は Ox 群で有意に増加し、NADPH diaphorase 陽性線維も増加していた。膀胱平滑筋では KCl、carbachol に対する収縮反応、EFS による acetylcholine の放出量は各群間で差はなかった。弛緩反応では isoproterenol に対する弛緩反応、膀胱組織内 cyclic AMP 濃度は Ox 群で有意に低下していた。E 群では上記のパラメーターは C 群と同程度まで改善された。【結論】去勢により雌家兔尿道では nitrergic nerves からの NO 放出量の増加とともに、adrenergic nerves からの norepinephrine 放出量の減少により尿道抵抗は低下し、膀胱平滑筋では β 受容体刺激による cyclic AMP の反応の低下により弛緩反応は抑制されると考えられた。またエストロゲンの補充はこれらを改善させることが示唆された。

SIII-4. ヒト前立腺肥大症腺腫の受容体の基礎的研究とその臨床応用

獨協医科大学泌尿器科

近藤 俊

【目的】ヒト前立腺腺腫に含まれる平滑筋組織には前立腺部尿道の収縮に関与する各種の受容体が存在する。前立腺肥大症ではそれらの受容体に変化が生じ、前立腺肥大症の病態に関与している。今回はヒト前立腺肥大症腺腫に見られる交感神経 α 、 β 受容体の変化、NANC 神経伝達に関与する ET-R (エンドセリン受容体) の変化や NOS (一酸化窒素合成酵素) の活性の変化、それらの変化と病態との関連、臨床的な薬物治療への応用の可能性について報告する。

【対象】前立腺腺腫は前立腺摘出術を受けた症例や悪性腫瘍で膀胱全摘出術を受けた症例から得た。両者の区別は臨床的な閉塞症状の有無と病理所見によった。

【方法】受容体測定 (α 、 β 、ET) には放射性元素で標識したリガンドを用いた。NOS 活性は arginine の生成量で測定した。

【結果】前立腺肥大症腺腫では交感神経 α 1、 α 2 受容体の増加、 β 受容体の減少、ET-R の増加、NOS 活性の減少がみられた。

【考察】 α 1 受容体は前立腺肥大症の閉塞症状に、 α 2 受容体は刺激症状に関与するので、各種の α 受容体阻害剤の前立腺腺腫に対する親和性を比較し薬物療法の効果を推定することが可能であった。ET-R や NOS の変化からは NO 放出薬剤の前立腺肥大症の薬物治療への応用の可能性が考えられた。

SIII-5. 新規勃起不全治療薬シルデナフィル（バイアグラ®）

ファイザー製薬（株）中央研究所
表 雅之，中村 孝昭，山中 教造

勃起不全は「性交時に十分な勃起が得られないため、あるいは十分な勃起が維持できないため、満足な性交が行えない状態」と定義され、我が国では300万人、全世界では1億人を超える患者が存在すると推定されている。陰茎勃起は、中枢性あるいは局所性の神経刺激により陰茎海綿体平滑筋が弛緩し、拡張した海綿体洞に血液が流入することにより発現する。従って、勃起不全は、様々な病因により、陰茎海綿体の弛緩機能が低下した状態と考えられる。陰茎海綿体の弛緩には、陰茎に投射する神経末端あるいは海綿体内皮細胞由来の一酸化窒素(NO)と、そのセカンドメッセンジャーであるcGMPが関与していることが知られている。

シルデナフィルは経口投与により有効性を示す世界初の勃起不全治療薬である。前臨床試験では、ヒト陰茎海綿体のcGMP分解酵素であるホスホジエステラーゼ タイプ 5 (PDE 5)の活性を選択的かつ競合的に阻害し、NO供与剤であるニトロプルシッドナトリウム (SNP)との併用により摘出ウサギ海綿体内のcGMP量を増大した。また、経壁電気刺激による摘出ヒト海綿体の弛緩反応ならびにメサコリン及びSNPによる摘出ウサギ海綿体の弛緩反応を増強し、骨盤神経刺激及びSNPによる麻酔イヌの陰茎海綿体内圧の上昇を血圧及び心拍数に影響を及ぼすことなく増強した。臨床試験では、勃起不全患者の挿入頻度および勃起の維持を改善し、また、高齢者、糖尿病患者、脊髄損傷における勃起不全に対しても有効性を示した。重篤な副作用はみられなかったが、シルデナフィルのPDE 5阻害作用によりNOの血管拡張作用が増強されたことから、硝酸剤あるいはNO供与剤との併用は禁忌とした。

SIII-6. 子宮収縮制御機構におけるカリウムチャネルとギャップ結合の役割

広島大学医学部産科婦人科学教室
三好 博史、大濱 絃三

新生児管理が著しく進歩した現在においても、早産の防止つまり子宮収縮を抑制することの重要性は変わっていない。子宮平滑筋細胞はL型Caチャネルが開いて活動電位が発生し、細胞内Ca濃度が上昇することにより収縮する。活動電位はギャップ結合により子宮全体に伝搬され同期した強力な収縮、分娩陣痛が発来する。Caチャネルの開閉は、膜電位により制御されている。そこで、妊娠ラット子宮より単離した子宮平滑筋細胞にPatch-clamp法を応用し、膜電位を制御するKチャネルの電流を記録解析した。また、対細胞の各々に同方法を使用し(Double patch-clamp法)、細胞間を流れるギャップ結合電流を記録した。

Whole-cell記録では比較的大きな外向きK電流が観察された。不活性化過程が緩やかなこの電流はtetraethylammoniumによりブロックされる遅延性矩形K電流であった。少数の細胞では不活性化過程が速い一過性K電流も観察され、4-aminopyridineに感受性が高いことよりA電流と考えられた。Inside-out記録では135pSのコンダクタンスを持つCa依存性Kチャネルが記録され、charybdotoxinの感受性よりBKチャネルとみなされた。

Double patch clamp法により記録されたギャップ結合電流は、その電位依存性より二種類に分類され、それぞれConnexin43および45の電流の性質によく一致していた。また、ギャップ結合コンダクタスは、妊娠中期では 5 ± 8 nSであったが分娩直前では 32 ± 16 nSと著増しており、陣痛発来時に細胞の興奮性伝搬が促進されることが示唆された。

それぞれのK電流、ギャップ結合電流の子宮収縮制御における役割を検討するとともに、子宮収縮抑制剤である β 刺激剤などの薬剤の作用についても述べる。

SIII-7. ラット子宮筋における内因性 NOS 阻害物質の妊娠期別動態と生理的役割

東京医科歯科大学産婦人科
坂本秀一

NO の子宮筋弛緩作用の有無に関しては未だ意見が一致していない。一方、iNOS が妊娠中の子宮筋で誘導され、陣痛発来時にはその活性は低下する事より NO は、妊娠子宮筋において何らかの役割りを担うと考えられるが、詳細は尚不明である。血管平滑筋において NO は、弛緩因子として働くだけでなく、endothelin-1(ET-1)の産生ならびに作用発現の調節因子として機能していることが明らかになってきている。この研究では、妊娠各期の NO の生理的役割りを明らかにするために最近注目されている内因性 NOS 阻害物質の子宮筋内での妊娠期別動態、SNP 誘発子宮筋弛緩作用、L-arginine 誘発 cyclic GMP 産生ならびに子宮筋における ET-1 含量の変化について検討した。ラット子宮筋中の内因性 NOS 阻害物質含量(L-NMMA+ADMA)は、妊娠中期と後期では減少、分娩直前ならびに直後では明らかに増加しており、NOS 活性と逆相関していたことから、内因性 NOS 阻害物質は妊娠子宮において NO 産生を制御していると考えられた。NO は、子宮筋弛緩を惹起しなかったが、子宮筋での ET-1 含量は、妊娠中期と後期では減少傾向を、一方、分娩直前ならびに直後では明らかに増加し、内因性 NOS 阻害物質含量の増減と密接に相関していた。また、L-NMMA 標品の投与によって非妊娠子宮筋での ET-1 含量が著明に増加した。以上の事実より、NO は ET-1 産生抑制作用を有し、ET-1 産生の制御を介して子宮筋収縮の調節に関与することが示唆された。

SIII-8. 子宮平滑筋におけるadrenergic受容体を介した反応の特性と、その妊娠中の変化

福岡大学医学部産婦人科
井上 善仁

産婦人科日常臨床において β_2 -adrenergic 受容体刺激剤は切迫早産の治療薬として汎用される薬剤である。しかし子宮平滑筋のアドレナリン受容体の特性や臨床上問題となる β_2 刺激剤の長期投与による脱感作の機序、個々の症例による効果の不安定性など、未解決の問題も多く残っている。我々はラットやヒトの妊娠子宮平滑筋に対して等尺性収縮法、微小電極法、 $[^3\text{H}]$ -dihydroaloprenolol 結合実験、cAMP 定量などの種々の方法で子宮平滑筋の β 受容体を介する反応の特性を検討した。ラットの妊娠子宮縦走筋の自発収縮に対するritodrineの抑制効果は妊娠中期(妊娠14、16日目)と妊娠後期(妊娠18、21日目)とを比較すると前者においてその抑制効果はより著明であり、妊娠経過とともに抑制効果の減弱があることが分かった。またritodrineの投与で一過性の収縮増強があり、これはphentolamineの前処置で消失することから α 受容体を介した反応であることが確認された。また妊娠後期のラット子宮においては輪走筋では妊娠21日まで α 受容体が優位であり22日目に β 優位に変化すること、縦走筋では妊娠の全期間を通じて β 受容体が優位であることが分かった。ラットでもritodrine投与中に脱感作現象が認められるが、ritodrine投与中にcAMP濃度は増減を繰り返し、抑制された収縮が再度出現する際には子宮筋のcAMP濃度は低く、収縮抑制中は高値となり、収縮とcAMP濃度は相関していた。一方 $[^3\text{H}]$ -dihydroaloprenolol 結合実験から①ritodrine長期投与中は β 受容体の密度は投与20分で最高となり以後cAMPと同様に増減を繰り返す② β 受容体の密度は妊娠後期に増加するが、受容体の β_2 刺激剤に対する親和性は主に解離速度の増加のため低下する③ヒト子宮筋では β_2 刺激剤の効果の不安定性は個々の標本の β 受容体数に依存することなどが示唆された。

SIII-9. アレルギー反応と気道平滑筋の収縮・拡張性

東北大学医学部第一内科
一ノ瀬正和

気管支喘息患者で認められる、軽度の刺激に対する過度の気道収縮反応（気道過敏性亢進）は、本疾患の病態及び治療を考える上で極めて重要な現象である。生体で観察される気道過敏性には、気道径の三次元構築に与る、気道壁の厚さ（気道浮腫の程度）及び気道内腔への分泌や、気道のつぶれ易さ（虚脱性）といった因子；ならびに気道平滑筋自体の収縮・拡張性が関与すると考えられる。今回の発表では、アレルギー反応がこの収縮・拡張反応にどのような影響を与えるかについて報告する。

1. 感作モルモットに抗原吸入チャレンジを4週間おこない慢性アレルギー性炎症モデルとした。本モデルで、コリン作動性神経刺激による気管平滑筋収縮反応は有意に増強したが、外因性に投与したアセチルコリンによる反応は影響されなかった。又、本モデルで、興奮性NANC神経（タキキニンが伝達物質）による気管平滑筋収縮反応はやはり増強した。一方、外因性タキキニンによる反応は影響されず、上皮（タキキニン分解酵素NEPの存在部位）の機能低下も認められなかった。つまり、タキキニンの産生/放出の増強がその機序と考えられた。

3. 抑制性NANC神経の伝達物質はVIPおよびNOである。この両伝達物質はアレルギー反応により放出されるトリプテース、活性酸素によりそれぞれ失活化され、その拡張反応も減弱する。

4. IgEはヒト気管支平滑筋においてコリン作動性神経由来の収縮反応を増強し、その機序は神経末端のオートレセプター（M₂受容体）の機能不全によるアセチルコリンの過放出と考えられた。

以上の結果から、アレルギー反応は気道平滑筋自体の収縮・拡張性を変化させるといふより、興奮性（収縮性）の神経機能亢進及び抑制性（拡張性）の神経機能低下を介して易気道狭窄性（気道過敏性亢進）を示すと考えられた。

SIII-10. 平滑筋の基礎と臨床－基礎研究から臨床応用－

気道平滑筋リモデリングと気道反応

九州大学大学院医学系研究科附属胸部疾患研究施設、国立療養所福岡東病院臨床研究部
井上博雅、相沢久道、福山 聡、古藤 洋、原 信之

気管支喘息は可逆性気道狭窄、気道過敏性、好酸球性気道炎症を特徴とする疾患である。また、喘息患者の気道では、上皮細胞の杯細胞化、上皮基底膜肥厚、気管支平滑筋の過形成・肥大などの構造的変化（リモデリング）がみられることが知られており、このリモデリングは好酸球浸潤を主体とした気道炎症が反復・持続する結果生じると考えられている。しかし、気道平滑筋リモデリングの気道過敏性への直接の関与は明らかではない。今回我々は、抗原反復曝露により平滑筋を中心とした気道リモデリングを呈する動物モデルを作成し、平滑筋リモデリングの気道反応に及ぼす影響を検討した。卵白アルブミン(OVA)の反復腹腔内投与で感作したマウスに、計3回・6回・または12回OVAを2～3日毎に反復吸入曝露した。最終曝露24時間後に、気道の組織学的変化・気管支肺胞洗浄(BAL)液中細胞成分・吸入アセチルコリン(ACh)に対する気道過敏性を測定した。さらに、ロイコトリエン(LT)拮抗薬を、抗原曝露期間中に経口投与し、気道リモデリングと気道過敏性への関与を検討した。組織学的には、OVA 3回曝露後に杯細胞過形成や気道への好酸球浸潤が認められ、6回曝露後には基底膜肥厚が、12回曝露後には気道平滑筋層の肥厚が出現した。BAL液中の好酸球数は、6回曝露後にピークを示し、12回曝露後には低下した。吸入ACh閾値は、OVA曝露6回後から12回後にかけて低下がみられた。抗原吸入を長期間反復すると、好酸球性気道炎症はむしろ軽減したが気道過敏性亢進は持続した。すなわち、気道平滑筋層肥厚という気道リモデリングの存在のみで気道過敏性亢進を惹起することが示唆された。LT拮抗薬は、OVA反復曝露による気道平滑筋層肥厚を抑制するとともにACh閾値低下を抑制した。LTは、気道炎症のみでなく、気道平滑筋リモデリングの促進も介して気道過敏性を亢進させているものと考えられた。

SIII-11. アレルギー性気管支喘息時の過敏性気管支平滑筋収縮における Ca^{2+} 感受性亢進現象の変化
 星薬科大学 薬理学教室
 千葉 義彦、三澤 美和

非特異的刺激に対する過剰な収縮反応性の亢進、すなわち気道過敏性はアレルギー性気管支喘息患者に共通の特徴である。また喘息患者においては、患者から摘出した気道平滑筋自体の反応性も亢進していることが知られている。このことは、喘息患者では気道平滑筋に何らかの変化が惹起されて平滑筋の収縮性 (contractility) が大きくなり、その結果わずかな刺激でも過剰な収縮反応を呈してしまうことが考えられる。当教室ではこれまでに、感作ラットに抗原を反復吸入チャレンジすることにより、再現性の良い気道過敏性状態が得られ、また、本気道過敏性モデルにおいては喘息患者と同様、摘出気管支平滑筋レベルでも過敏性が獲得されていることを報告している。このラット気道過敏性モデルを用いて種々の検討を行った結果、気道過敏性時の気管支平滑筋において acetylcholine (ACh) に対する反応性は亢進しているものの、muscarine 受容体数あるいは antagonist affinity は正常レベルであることを明らかにした。また、気道過敏性時の気管支平滑筋においては三量体 GTP 結合タンパク質レベルが増加しており、その結果、muscarine 受容体の agonist affinity が著しく大きくなっていることを明らかにした。一方、肺内気管支平滑筋 skinned fiber 標本を用いて検討を行ったところ、ACh 非存在下での Ca^{2+} による収縮反応は正常レベルであったが、ACh 存在下でいわゆる Ca^{2+} sensitization を観察したところ、この ACh 誘発 Ca^{2+} sensitizing 効果は気道過敏性時には著明に増強されており、また、この ACh 誘発 Ca^{2+} sensitization は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の不活化薬の前処置により完全に抑制された。以上の結果より、抗原誘発気道過敏性時には気管支平滑筋収縮を調節している細胞内情報伝達系にさまざまな変化がもたらされ、その結果気道過敏性亢進を呈するようになることが示唆された。

SIII-12. 平滑筋の基礎と臨床—基礎研究から臨床応用—

気道平滑筋のムスカリン受容体に関する検討

秋田大学第二内科¹, 同医療技術短期大学部²

加賀谷学¹, 塩谷隆信², 佐野正明¹, 進藤 勉¹, 伊藤武史¹, 佐藤一洋¹,
 渡邊亜紀子¹, 鹿島正行¹, 佐々木昌博¹, 三浦 博¹

気道平滑筋は交感神経と副交感神経による相反性拮抗支配を受けるが、通常は副交感神経が優位に働き緊張性に気道平滑筋を収縮状態に保っている。また我々および諸家の報告より、気道平滑筋のムスカリン受容体は、副交感神経節にM1受容体、気道平滑筋上にM3受容体が分布し収縮に関与し、副交感神経節後線維にM2受容体が存在しautoreceptorとして抑制性に機能していると考えられている。従って、閉塞性肺疾患に対する抗コリン剤は、M1およびM3については選択的拮抗作用を有する一方でM2に対しては活性作用を有するかあるいは拮抗作用が小さいことが理想と考えられる。そこで我々は種々の抗コリン剤のムスカリン受容体選択性について検討した。その結果抗コリン剤であるipratropium bromide, flutropium bromide, oxtropium bromideともにatropineに匹敵する抗コリン作用を有するが、各薬剤ともに受容体選択性に乏しく、作用機序からみて臨床的にはM3拮抗作用の大きい薬剤の選択が現時点では賢明と推察された。また老年者の気管支喘息患者における抗コリン剤の効果について検討した結果、若年者気管支喘息群および老年健康者群に比して呼吸機能の改善率は有意に高値であった。従って、老年気管支喘息では若年者気管支喘息に比して、副交感神経緊張に伴う気道平滑筋収縮に強く影響を受けている可能性が示唆された。気道における副交感神経系は、均等に分布する交感神経系と異なり、比較的中枢側の気道に密に存在していることが生理学実験より報告されている。我々はPETを用いて、ヒト肺内ムスカリン受容体分布の確認を試みている。それらの知見もあわせて、呼吸器内科の立場からムスカリン受容体に関する情報を提供したいと考えている。

LS. 新規 α_1 受容体遮断薬、塩酸タムスロシン（ハルナール[®]）の研究開発

山之内製薬株式会社 創薬研究本部 薬理研究所
佐藤 修一，本田 一男

前立腺肥大症（BPH）は男性の加齢とともに前立腺が肥大し、排尿困難等の閉塞症状が現れる疾患である。BPHに伴う排尿障害は肥大した前立腺による尿道の機械的圧迫と交感神経活性の亢進による前立腺および尿道の機能的収縮で発現すると考えられている。

山之内製薬は1976年よりスルファモイルフェネチルアミン誘導体の合成研究と下部尿路系の生理機能解明研究を実施し、尿道および前立腺において α_1 受容体が平滑筋収縮に重要な役割を担うことを明らかにした。また、スルファモイルフェネチルアミン誘導体の中から強力かつ選択的な α_1 受容体遮断薬である塩酸タムスロシンを発見し、本薬が下部尿路組織に対して選択的に作用することを示した。

臨床において、塩酸タムスロシンの徐放性製剤（本剤：ハルナール[®]）を開発し、BPHに伴う排尿障害患者を対象としたプラセボ対照二重盲験法による用量設定試験から0.2 mg/日を至適用量として選択した。さらに、プラセボと比較した第Ⅲ相試験において、血圧に影響を及ぼすことなく排尿困難を改善し、1993年、本邦にてBPHに伴う排尿障害を適応として承認された。塩酸タムスロシンは徐放化により起立性低血圧を起こし難くし、かつ初回より固定用量で投与可能な最初の α_1 受容体遮断薬である。

近年、 α_1 受容体は α_{1A} 、 α_{1B} および α_{1D} の3種のサブタイプに分類されている。 α_{1A} 受容体はヒト前立腺および尿道において優位に存在し、その収縮機能において重要な役割を果たしている。塩酸タムスロシンはこのサブタイプに選択性を有しており、下部尿路への選択性との関連性が示唆されている。しかしながら、 α_1 受容体サブタイプに関する種々の研究から、本薬の下部尿路への選択性は単に α_{1A} 受容体サブタイプへの選択性だけでは十分には説明できないと考えられる。現在、塩酸タムスロシンの下部尿路選択性に関して、特に下部尿路組織での作用持続性に着目し研究を進めている。

一 般 口 演

1. ラット近側結腸自発運動の律動性収縮に対するシクロピアゾン酸の効果

奈良県立医科大学第二生理、第一外科 *

米田 諭、門脇 真、杉森志徳 *、山内昌哉 *、高木 都

ラット近側結腸の規則的な律動性収縮における Ca^{2+} 筋ハンドリング機構を解明するため、筋小胞体 Ca^{2+} ポンプ阻害薬シクロピアゾン酸 (以下CPA) の効果を検討した。Wistar系雄性ラット(250-350 g; 6-8 W) をネブタール 50 mg/kg i.p.により麻酔後に、近側結腸の摘出を行った。回盲部より 3 cm 口側の近側結腸の標本 2 cm を作製した。マグヌス法で isometric force transducer を用い、縦走筋方向の自発運動に対する CPA 10^{-6} M の効果を amplitude と frequency で検討した。さらに、L-type Ca^{2+} channel blocker の Nicaldipine 10^{-11} M、capacitative Ca^{2+} entry を block する SK&F 96365 10^{-8} M、 Na^{+} - Ca^{2+} exchanger を block する KB-R 7943 10^{-6} M で前処置後、CPA 10^{-6} M の効果を検討した。次に、20-40 W、80 W のラットで、同様の方法を用い、CPA 10^{-6} M の効果を検討した。CPA はイヌの近側結腸でペースメーカー細胞の slow wave の Frequency を減少させると報告されているが、ラット近側結腸では律動性収縮の Amplitude と Frequency は CPA 投与後、有意に増加した。Amplitude の増加は Nicaldipine および SK&F 96365 で前処置すると抑制されたが、KB-R 7943 では抑制されなかった。Frequency の増加は Nicaldipine、SK&F 96365、KB-R 7943 で前処置しても抑制されなかった。週齢が進んだラットでは、CPA の投与により Frequency は全個体で増加傾向にあったが、Amplitude が減少または不変の個体がみられた。以上より、CPA によるラット近側結腸律動性収縮の Amplitude の増加には L-type Ca^{2+} channel、capacitative Ca^{2+} entry を介した Ca^{2+} の関与が考えられるが、ペースメーカー細胞の Frequency の増加に、これらの関与は少ないと考えられる。週齢が進むとともに、CPA による L-type Ca^{2+} channel、capacitative Ca^{2+} entry を介した Ca^{2+} による Amplitude 増加作用は減弱するが、Frequency の増加作用に変化はないと考えられる。

2. モルモット遠位結腸輪走筋のコリン作動性収縮反応に及ぼす 2-arachidonoyl glycerol の効果

獨協医科大学薬理学教室¹、帝京大学薬学部衛生化学教室²

児嶋修一¹、渋川朝子¹、内田幸介¹、杉浦隆之²、和久敬蔵²、上川雄一郎¹

目的 2-arachidonoyl glycerol(2-AG)は anandamide とともにカンナビノイド様作用を示す新しいタイプのアラキドン酸誘導体として報告されているが、平滑筋組織におけるこれらエイコサノイドの作用はまだ解明されていない。今回、モルモット遠位結腸輪走筋標本のフィールド電気刺激(EFS, 1Hz, 0.3 ms)誘発コリン作動性収縮反応に及ぼすこれらカンナビノイド様エイコサノイドの効果を検討したので報告する。**方法** 雄性モルモットより遠位結腸を摘出し、粘膜を剥離した後、短冊型(8x4mm)の輪走筋標本作製した。これを混合ガス通気下、37℃ Krebs 液(eserine 0.1 μ M, hexamethonium 100 μ M, indomethacin 3 μ M, L-nitroarginine 100 μ M 含む)で満たした 10ml オルガンバス中に懸垂し、その機械的変化を等張性に記録した。**結果** ①EFS 誘発コリン作動性収縮反応は 2-AG(0.1-1 μ M)によって濃度依存的に抑制されたが、anandamide (0.1-1 μ M)では何ら影響されなかった。②2-AG(1 μ M)の抑制作用は SR141716A(1 μ M, カンナビノイド CB₁-受容体拮抗薬)及び SR144528 (1 μ M, CB₂-受容体拮抗薬)によって拮抗されなかった。③2-AG(1 μ M)は acetylcholine(10 μ M), substance P(0.3 μ M), KCl(100mM)による収縮を強く抑制した。

結論 モルモット結腸輪走筋のコリン作動性神経伝達に対して 2-AG は postjunctional な抑制効果を示したが、関与する受容体機構は従来の報告とは異なることが示唆された。

3. 雑種成犬を用いた排便運動に対する電気生理学的研究（第4報） （仙骨神経電気刺激による結腸ペースメーカー作成の可能性）

国立栃木病院小児外科¹、聖路加国際病院小児外科²、慶應義塾大学医学部外科³、生理⁴
平林 健¹、松藤 凡²、横山 穰太郎³、吉岡成浩³、星野 健³、森川康英³、北島政樹³、
渡辺修一⁴、羽 金 祐 彦¹

小児外科領域においては、高位鎖肛等排便障害を来す症例が数多く認められ、これらは仙骨奇形を合併することが多く、神経支配の異常が排便障害に関与している可能性が考えられる。今回、排便運動に対する仙骨神経支配の解明、さらに、仙骨神経電気刺激による結腸ペースメーカー作成の可能性を、雑種成犬を用いて電気生理学的に考察した。

（方法）①ストレインゲージ（SG）を、近位結腸（SG1）、遠位結腸（SG2）、S状結腸（SG3）、直腸（SG4）、内肛門括約筋（SG5）に横軸方向に縫着し、術後3週間後より意識下排便時の各腸管運動を観察した。②椎弓切除を加え、仙骨神経に電気刺激（1-5mA；0.5mSec,10Hz,10Sec、2.0mSec,2.5Hz,20Sec、0.5mSec,100Hz,10Sec）を加え、各腸管運動の反応を観察した。

（結果）①9匹の犬において、133回の意識下排便を観察した。排便時には巨大な収縮運動が遠位結腸（70例8匹）に生じ、直腸（80%）及び内肛門括約筋（63%）が弛緩し排便が開始した。収縮運動が直腸（93%）、内肛門括約筋に伝播し、便が排泄され、排便が終了した。②仙骨神経電気刺激（1-5mA,0.5mSec,10Hz,10Sec）により、14例中6例（S1:4/14, S2:4/14, S3:2/14）に遠位結腸から直腸への収縮運動の伝播が、14例中4例（S1:2/14, S2:2/14, S3:1/14）に遠位結腸の収縮に連動した直腸の弛緩が観察された。刺激条件によって直腸の弛緩収縮の反応に差は認められなかった。

（考察）仙骨神経に電気刺激を加える事により、排便様の結腸直腸運動が誘発され、左半結腸運動が仙骨神経を介して調節されることが示された。排便時の結腸直腸運動に対するペースメーカー領域が仙骨神経領域に存在することが示唆された。さらに仙骨神経電気刺激により左半結腸運動がコントロールされることが示され、仙骨神経電気刺激による結腸ペースメーカー作成の可能性が示された。

4. 直腸肛門反射の構成因子としての外肛門括約筋（EAS）の応答の特徴

東海大学 医学部 生理・慶応大学 医学部 外科・東海大学 医学部 第二解剖
高比良 英輔・難波 貞夫、猪原 則行、田村 謙二、横山 穰太郎・清木 勘治

直腸肛門反射というのは、直腸にバルーンを入れて、人為的に拡張すると、肛門管内圧が一過性に下降する現象をいう。'60年代の後半に、英国の小児外科医(LawsonとNixon)によって、無神経節腸管（ヒルシュスプルング病）の患児では、この反応を欠くことが発見され、広く知られるようになった。

ところで、ヒトおよびここで実験に用いたイヌとネコの肛門管は、長さ数cmの管腔を囲んで、内側を輪状平滑筋—内括約筋（IAS）が、その外側を、前者の約1.5倍の厚さの輪状骨格筋—外括約筋（EAS）が取囲む構造になっている。肛門管の下端1/4では、IASは、その高さの上で終わっていて、EASの末端が管腔にせりだすような形になっている。

上述の直腸伸展刺激を与えたとき、反射応答の主体をなす、肛門管内圧の下降（IASの自発性反復興奮の経神経性抑制）とは別に、EASにも明確な反射応答があるか、あるとすればどんな機能的特徴があるかというのは、我々の実験を初めた時からの疑問であった。

実験の初期に、解剖の教室から提示されたイヌ肛門管の冠状断染色標本に基づいて、肛門縁末梢皮膚表面電極が、EAS活動を最も独占的に記録できるのではないかと考えた。その電極によって、直腸伸展に対し、長潜時・漸増のスパイク発射が記録された。しかし、この応答パターンは、文献にも記載され（G.Bishopら,1956）、我々も深部電極で記録した、除脳ネコのEAS持続発射スパイクの、直腸伸展による即時抑制とは正反対のパターンであった。

昨年来のこの問題についての再検討の結果を報告する。EASの上記のような応答の二型は、記録電極のEAS内の位置に依存することが確認された。しばしば、1つの双極電極で、両型の混合型（初期抑制—後期発射）の応答が記録されることも気づかれた。現在のところ、この応答パターンの特異性は、EASの筋束の構造的分離によるものであり、ひいては仙髄オヌフ核における、直腸伸展入力との相反性構成に由来すると考えられる。

5. 形状記憶高分子ゲルを用いた人工肛門括約筋作製の試み

聖路加国際病院小児外科，慶應義塾大学外科¹⁾，北海道大学大学院理学研究科²⁾

松藤 凡，横山 穰太郎¹⁾，長田 義仁²⁾ Gong GianPing²⁾ 松田 篤²⁾，金子 達雄²⁾

緒言：形状記憶高分子ゲルは，温度，電位，pH，磁性などの変化に伴いその形状が変化し，これらの条件が元に戻るとゲルの形状も初めの状態に復する特性を有する．今回実験に用いたゲルは，アクリル酸メチルとアクリル酸ステアリルの共重合ゲルである．その弾性率は温度変化に伴い 38°C 付近で急激に変化し，低温 (35°C) で大きく高温 (40°C) では小さい．円筒形 (内径 2.0cm，外径 2.3cm，高さ 2.0cm) の本ゲル (人工肛門括約筋) は，高温では弾性率が小さいため外力により内径は容易に増大し，外力が除かれればすぐに元の形状に復する．一方，低温では伸縮性が減少し少々の外力では変形しない．これは括約筋が弛緩や収縮した状態に類似している．

方法：成犬を静脈麻酔下に開腹し遠位結腸の切断端を円筒形ゲルに通した．ストレインゲージを用いた犬の自然排便時の観察では，結腸の巨大蠕動波により便は肛門側へ運ばれ排泄される．Neostigmine 0.1mg 静脈投与にて，この巨大蠕動波と同等の収縮力を持つ蠕動波を躍起し，低温 (35°C) での便の保持能力と高温 (40°C) での便の通過性について検討を加えた．

結果：低温では，腸内容はゲル部を通過せず，その口側に貯留し保持された．一方，高温では，蠕動に伴う腸内容の移動によってゲルは押し広げられ便は排泄された．便が無くなるとゲルはすぐに元の口径にもどり，降温することで再び便は保持された．

考察：肛門括約筋の主な機能は，収縮による禁制の保持と排便時に弛緩し便を通過せしめることにある．形状記憶高分子ゲルを用いた本装置は，シリコンゴムバンドや AMS-800 などの従来型装置に比して本来の肛門括約筋により近い特性を発揮し，人工括約筋作製やストーマ管理などの臨床応用への可能性を有することが示唆された．

6. STZ誘発糖尿病ラット頸動脈における弛緩反応の変化

星薬科大学機能形態

大内 邦弘，鎌田 勝雄

糖尿病合併症の主な原因の一つとして血管障害があることはよく知られている．血管平滑筋は，血管内皮細胞由来の様々な因子によって調節されているが，糖尿病態時にはこれらの働きが何らかの原因によって障害を受け，血管障害を引き起こすと言われている．そこで streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラット頸動脈における弛緩反応の変化について control 動物と比較検討を行った．STZ を尾静脈内投与して，10 週間後のラットを糖尿病動物として実験に用いた．摘出した頸動脈を幅約 3 mm のリング標本とした後，10 ml の organ-bath に懸垂し弛緩反応を観察した．isoproterenol による弛緩反応は，糖尿病群で有意に減弱したが，glibenclamide (GBC) の影響を受けなかった．forskolin による弛緩は，両群において有意な差を生じず，また GBC の影響も受けなかった．このことより，糖尿病態時には adenylate-cyclase 以降の細胞内情報伝達機構は障害を受けておらず， β -R の down-regulation が起きていることが示唆された．また，ACh による弛緩反応は糖尿病群において有意に減弱した．L-NOARG は ACh による弛緩を有意に抑制したが，糖尿病群より control 群においてより強く抑制した．しかし，同時に indomethacin を処置しておくとも，両群ともほぼ同程度に抑制された．このことから，糖尿病態時には NO による弛緩の割合が減弱し，代償的に PGs の割合が増加していることが示唆された．しかし，EDHF による弛緩は変化がないことが示唆された．これらのことより，糖尿病態時には血管内皮細胞および平滑筋細胞において様々な機能変化が生じていることが示唆された．

7. インスリン抵抗性マウスの胸部大動脈における薬物反応性

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室
猪瀬明美、鎌田勝雄

糖尿病は、インスリン依存型糖尿病 (IDDM) とインスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) に分けられ、これらの合併症の多くは血管障害が関与している。そこで今回、NIDDM モデル動物及びIDDM モデル動物の胸部大動脈を用いて、内皮細胞、平滑筋細胞の機能変化について検討した。【方法】実験には、control 動物として、ICR 雄性マウスを用いた。fructose 餌負荷動物には、60% fructose 餌を負荷させ、糖尿病動物には、streptozotocin (STZ) を尾静脈投与し、12 週間後実験に用いた。胸部大動脈を摘出してリング標本とし、ACh 及び SNP による弛緩反応、NE 及び 5-HT、等張性 high K^+ による収縮反応を観察した。【結果・考察】血漿 insulin 値は fructose 群において有意に増加し、STZ 群では有意に減少した。血漿 glucose 値は STZ 群において有意に増加した。血漿の総 cholesterol、HDL、LDL はいずれも STZ 群、fructose 群共に有意に増加した。ACh による弛緩反応は、STZ 群、fructose 群共に有意に減弱したが、SNP による弛緩反応には差は見られなかった。このことから fructose 群、STZ 群では内皮細胞が障害を受けていると考えられる。NE による収縮反応は L-NOARG と indomethacin の未処置、処置の両方で fructose 群において有意に減弱し、5-HT による収縮反応は L-NOARG と indomethacin の未処置、処置の両方で STZ 群において有意に増加した。しかし、high K^+ による収縮反応には差がなかったことより NE、5-HT による反応の変化は、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルや平滑筋の Ca^{2+} 感受性の変化によるものではなく、fructose では平滑筋の α 受容体を介した反応性低下、STZ 群では 5-HT 受容体の作用増強によるものではないかと考えられる。

8. 自然発症糖尿病マウスの胸部大動脈における収縮反応と弛緩反応の検討

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態研究室
蟹江典靖、鎌田勝雄

糖尿病態時では血管内皮細胞障害による内皮依存性弛緩反応が減弱し、高血圧を誘発する危険率が上昇するとされ、その原因物質として血中 LDL が関与しているとされている。そこで今回、II 型糖尿病モデルである自然発症糖尿病マウスの胸部大動脈を用いて、収縮反応および弛緩反応について検討した。また、コレステラミンを 4 週間慢性的に投与し、収縮反応がどのように変化するかを検討した。実験には、糖尿病動物として自然発症糖尿病マウスをもちいた。そして、慢性投与動物作成には 8 週齢より 4 週間コレステラミン (300 mg/kg) を経口投与した。摘出した胸部大動脈は幅約 3 mm のリング標本とした。

NE の収縮反応では、control 群に対し糖尿病群では有意に増強したが、L-Arginine (10^{-3} M) 前処置により、この増強された収縮反応は control レベルまで回復した。また、ACh による弛緩反応においても有意に減弱した。これらのことから、糖尿病群における NE 収縮の増強は内皮細胞からの NO 遊離の減少が示唆された。また、indomethacin + L-NOARG 前処置による NE 収縮は control 群、糖尿病群間において有意な差がみられることから、糖尿病態時における収縮の増強は内皮障害によるものだけではないということが考えられる。5-HT による収縮反応は、control 群に対し糖尿病群では有意に増強したが、indomethacin + L-NOARG 前処置においてもほとんど影響を受けていないことから 5-HT の収縮には内皮障害が関与していないことが示唆された。High K^+ による収縮反応において、control 群に対し糖尿病群では有意に増強したことから、糖尿病態時には平滑筋の収縮能に変化が生じているものと考えられる。

9. 糖尿病性腎不全による透析患者の胃運動について —¹³C-acetateを用いた呼気胃排出機能検査からの評価—

弘前大学医学部第三内科

渡辺拓、中村光男、梶麻子、寺田明功、楠美尚子、長谷川範幸、小川吉司、
須田俊宏

[目的]糖尿病患者では、糖尿病性自律神経障害による胃麻痺の合併がしばしば認められる。糖尿病性胃麻痺は糖尿病の罹病期間が長く、血糖コントロールの悪い糖尿病患者に多く、血糖コントロール悪化の原因ともなっている。また、糖尿病性腎不全による透析患者では糖尿病性自律神経障害の合併頻度も高く胃運動の低下が推定される。そこで、今回我々は胃では吸収されず小腸に排出されて吸収される¹³C-acetateを用いた呼気胃排泄機能検査を行い糖尿病性腎不全患者と健常者について比較検討した。

[対象及び方法]健常者14例及び、糖尿病性腎障害による透析患者14例を対象した。早朝空腹時にテストミールとして¹³C-acetate 100mgを混入したOKUNOS-A 300ml (300kcal)を摂取させ、前、15、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180分後に呼気採取を行い、呼気中¹³CO₂濃度を測定した。

[結果]健常者では61.43±17.26分後に呼気中¹³CO₂濃度のピークが認められたが、糖尿病性腎不全患者では138.57±29.49分後にピークが認められ、130分値及び150分から180分値では有意差が認められた。また、前値と180分後の呼気中¹³CO₂濃度の差を比較すると健常者では平均16.49であったが、糖尿病性腎不全患者では平均26.25であった。すなわち、糖尿病性腎不全患者では健常者と比較して¹³Cの呼気中排泄の増加が遅く、また減少も遅くなる傾向が認められた。これは糖尿病性腎不全患者の胃排出能の低下を反映している結果と考えられた。

10. 圧刺激および化学刺激により生じる胃上部弛緩運動に関する実験的検討

広島大学第2外科

吉川雅文、岡島正純、清水洋祐、中島真太郎、羽路一、池田聡、児玉真也、小林理一郎、有田道典、中原雅浩、小島康知、川堀勝史、浅原利正、土肥雪彦

【はじめに】胃上部は食物摂取時に、自ら弛緩し、胃内圧の上昇を抑える機能を有している。この反応は、単離胃の基礎実験から、non-adrenergic, non-cholinergic神経を介し、神経終末からの一酸化窒素（以下NO）の放出により生ずると考えられている。しかし、生体内での消化管運動にはコリン作動性機構が大きく関与している。【目的および方法】生体内における、圧刺激および化学刺激により生じる胃上部弛緩運動に対するコリン作動性機構、およびNOの影響を検討する目的で、以下の実験を行った。胃瘻を造設した雑種成犬（n=4）に、意識下無拘束でpolyethylene bagを胃上部に挿入し、これをBarostatに接続した。1) 圧刺激：bag内に90ml/minの一定速度でairを注入し、胃を拡張させた時の内圧の変化を観察した。2) 化学刺激：4mmHgにbag内圧を固定後、化学刺激として20%イントラリボスを経口投与し（2ml/kg）、胃運動の変化を観察した。それぞれについて、通常の状態をコントロールとして、アトロピン投与後（0.05mg/kg i.v.）、L-NNA投与後（5mg/kg i.v.）に同様の実験を行った。【結果】1) 圧刺激：コントロールではbag内圧が、およそ6mmHgに達すると、胃上部に弛緩が生じ、内圧上昇が抑えられた。アトロピン投与後、胃のtonusが低下し、内圧上昇が全体に緩やかとなった。L-NNA投与後、コントロールと比較し、6mmHgを越えるあたりから内圧が有意に高くなった。2) 化学刺激：コントロールでは、化学刺激により、胃上部に急激な弛緩運動が観察された（157±92ml）。アトロピン投与後、胃のtonusが低下し、化学刺激による弛緩運動が観察されなかった。L-NNA投与後、コントロールと同様の弛緩運動が観察された（148±48ml）。【まとめ】意識下雑種成犬を用いて、胃上部弛緩運動に関する実験的検討を行った。圧刺激による胃上部弛緩運動には、NOおよびコリン作動性機構がともに関与していると考えられた。これに対して化学刺激による胃上部弛緩運動には、NOの関与は少なく、コリン作動性機構が大きく関与していると考えられた。

11. 脂肪製剤投与により生じる胃の弛緩運動に関する実験的検討

広島大学第2外科

羽路 一、吉川雅文、岡島正純、清水洋祐、中島真太郎、池田聡、児玉真也、
小林理一郎、中原雅浩、川堀勝史、浅原利正、土肥雪彦

【目的】胃上部は様々な刺激（圧刺激や化学的刺激）に対して弛緩反応を示す。我々はこれまでに意識下雑種成犬を用いて、胃上部の弛緩運動について報告してきた。今回、脂肪製剤の投与経路の違いが胃上部の運動に与える影響を検討する目的で、以下の実験を行った。

【方法】あらかじめ胃瘻を造設した雑種成犬（N=4）に、意識下無拘束でpolyethylene bagを胃上部に挿入し、これをBarostatに接続した。4mmHgにbag内圧を固定後、

- 1) 脂肪製剤として20%イントラリポスを経口的に投与し（2ml/kg）、胃運動の変化を観察した。
- 2) 20%イントラリポスを経静脈的に投与し（1ml/kg i.v.）、同様の実験を行った。

また、bag容量は各薬剤投与前の容量を100%として、それに対する割合で算出した。

【結果】1) 20%イントラリポスの経口投与後、胃上部に急激な弛緩反応が観察された。この反応は約5分間で最大値に達し、以後それ以上の弛緩反応は認めず、定常状態となった（5分：274.1±120.4%、10分：273.9±137.9%）。

2) 20%イントラリポスの経静脈的投与後、胃上部は徐々に弛緩した（10分：160.3±54.7%、20分：206.0±79.8%、30分：261.1±118.9%）。

【まとめ】意識下の雑種成犬を用いた検討により、脂肪製剤は経静脈的投与によっても胃上部に弛緩反応を引き起こすことが確認された。また、その弛緩反応のパターンは経口投与の場合と異なっており、経静脈的投与の弛緩反応には、経口投与の場合と異なった制御機構が存在することが示唆された。

12. 新しい薬理学的指標を導入したアセトアミノフェン法液状食胃排出能検査法の臨床的評価 - RI法との同時施行による比較検討 -

慈恵医大・外科¹⁾、慈恵医大・放射線科²⁾、東京医歯大・難研・予防医学³⁾

中田 浩二¹⁾、羽生 信義¹⁾、梁井 真一郎¹⁾、向井 英晴¹⁾、古川 良幸¹⁾、

内山 眞幸²⁾、森 豊²⁾、奇 錦峰³⁾、峰下 哲³⁾、青木 照明¹⁾

アセトアミノフェン（APAP）法は液状食の胃排出能検査として臨床的に広く行われているが、検査法としての信頼性や位置づけについては十分に検討されていない。われわれはバイオアベイラビリティの概念を導入した新しい薬理学的指標を用いることによりこの検査法の信頼性を増し、さらに、APAP法においても液状食の胃排出動態の定量的な評価が可能であることを報告してきた。【目的】今回われわれはAPAP法とRI法とを同時に行うことにより、新しい評価指標を導入したAPAP法の臨床的評価を試みた。【方法】健常人6名に液状試験食として、カロリーメイト 200mlに99mTc-DTPA 40MBqとAPAP 500mgをよく混和したものを摂取させ、摂取前（RI法では摂取直後）と摂取後15、30、45、60、75、90、105、120、150、180、210、240、300、360分後に、採血とガンマカメラによる撮影を行った。血中APAP濃度はHPLC法にて測定した。コンピュータープログラムで全曲線下面積（AUCinf）を算出し、各測定時間xにおける胃内残存率を $1 - \text{AUC}_x / \text{AUC}_{\text{inf}}$ （%）とし、RI法による同測定時間の胃内残存率と比較して両者の相関性について検討した。【結果】APAP法では、RI法と比べ胃排出曲線の勾配が小さく、胃排出の遅延傾向がみられた。各測定時間の胃内残存率において、摂取後90分まで有意な相関が認められた。【結論】直接法であるRI法と比べて間接法であるアセトアミノフェン法では、吸収・分布・代謝・排泄などの影響により見かけ上の胃排出遅延が認められた。しかし、摂取後120分までの各胃内残存率では有意な相関が認められ定量的な評価も可能であることから、経時的な液状食の胃排出動態を反映し臨床的に有用な検査法と考えられた。

13. RI法との同時測定によるX線不透過マーカーを用いた胃排出試験の検討

東京慈恵会医科大学外科

梁井真一郎, 中田浩二, 羽生信義, 宮川 朗, 向井英晴, 西川勝則, 山本 尚, 古川良幸,
青木照明

[目的]RI法による胃排出検査は直接的定量的検査法であり, 現在もっとも信頼性が高い測定法であると考えられている。しかし, 放射線の被爆, 放射性物質の取扱い, 特殊な測定設備を必要とすることなどの問題がある。X線不透過マーカーを用いた胃排出試験は特殊な測定設備を必要とせず, より簡便な検査法として注目されている。今回, RI法との同時測定によりX線不透過マーカー法胃排出試験の有用性を検討した。[方法]健常人7名に^{99m}Tc-DTPAで標識したホットケーキ試験食(291kcal)を与え, 摂取直後にレントゲン不透過マーカー(Sitzmarks)を経口投与した。ガンマカメラによる胃内放射線活性の測定を試験食摂取後60分までは10分おきに, それ以降は30分おきに6時間まで行い, アイソトープ法による胃排出能検査を行った。同時に腹部レントゲン撮影を60分おきに行いマーカー法による胃排出能検査を行った。[成績]アイソトープ法とマーカー法の胃内残存率(60, 120, 180, 240, 300, 360分値), 排出開始時間, 1/2排出時間, 全排出時間について比較検討した結果, アイソトープ法とマーカー法の間に強い相関が認められたのは全排出時間のみであった(相関係数0.785)。[結論]マーカー法は簡便な検査法ではあるが健常人においてアイソトープ法と比較して必ずしも経時的胃排出動態は一致しないと考えられた。しかし, 全排出時間の測定による定性的な胃排出能検査法としては臨床的に有用と考えられた。

14. 意識下ラットの胃収縮運動に対するRho-associated kinase阻害剤Y-27632の影響

群馬大学小児科, 群馬県立小児医療センター外科

友政 剛, 金子浩章, 渡部登志雄, 田端雅彦, 森川昭廣, 高橋 篤

【背景および目的】p160ROCK/Rho kinaseの選択的阻害剤であるY-27632は, myosin light chainのリン酸化を抑制する, 新しいタイプの平滑筋弛緩剤である。Y-27632は, phenylephrineによる血管平滑筋の収縮を抑制し, 高血圧ラットの血圧を低下させることがすでに示されているが, 腸管平滑筋に対する作用については報告がない。本研究では, ミニチュアトランスデューサーを用いて意識下ラットの胃収縮運動に与える, Y-27632の作用を検討した。

【対象および方法】雌性Wistar rats(約400g)をネブタール麻酔下に開腹し, ミニチュアトランスデューサー(FT-08, Star Medical)を胃幽門5mm口側漿膜面に縫着した。5-7日の回復期間, および2-4時間の飢餓の後, Y-27632(0, 3.3, 10.0mg/kg)を尾静脈に確保したラインから静注した。投与3時間前から後1-2時間までにトランスデューサーから得られた信号を, コンピューターにとり込み, 市販の解析ソフト(8スター, Star Medical)で解析した。

【結果】Y-27632 3.3 mg/kg および 10.0mg/kg 投与直後から, 胃の収縮圧は低下した。投与後20分間の平均収縮圧は投与前の, 35.6%(10.0mg/kg)および49.1%(3.3mg/kg)であったが, 約100分で投与前のレベルに回復した。Motility Index(収縮波の積分値)は投与直後の20分間は, 33.7%(10.0mg/kg)および45.4%(3.3mg/kg)であり, これも約100分で徐々に投与前のレベルに復した。収縮の頻度には明らかな変化を認めなかった。投与後に, 腹部膨満, 嘔吐, 下痢などは認めず, 死亡した個体もなかった。

【まとめ】Y-27632, 3.3 mg/kg および 10.0mg/kg, の静注は, 意識下ラットの胃運動を一過性に抑制した。

15. 意識下ラットの胃運動に対する vincristine の影響 -投与直後の反応の検討-

群馬大学小児科、群馬県立小児医療センター外科*
金子浩章、渡部登志雄、田端雅彦、高橋 篤*、友政 剛、森川昭廣

【背景・目的】 vincristine(VCR)の副作用として、便秘、嘔気・嘔吐、食欲不振を認めることがあり、下部消化管運動異常が想定されているが、上部消化管運動異常の有無については明らかでない。ラットを用いた過去の検討では、投与24時間後に胃運動の有意な低下が認められている。本研究では同様の意識下ラットモデルを用いて投与直後の胃運動の変化の有無を検討した。

【方法】 Wistar系雄性ラット、体重約400gを対象とした。幽門から口側 5 mmの前庭部後壁、輪状筋方向にフォーストランスデューサー (F08-IS,スターメディカル)を縫着し、増幅器を通じてパーソナルコンピューターに接続した。24時間絶食後、術後6日目にcontrol(0.9% NaCl), VCR 0.075, 0.25, 0.75 mg/kgを静注し、その後12時間の胃収縮波を連続記録した。投与後2時間毎の収縮波の積分値を投与前2時間の収縮波の積分値で除した値を胃運動指数比として比較した。

【結果】 投与1時間後頃から、胃運動は亢進(波高・収縮波数が増加、収縮波群内での収縮波の頻度は不変)し、徐々に低下した。投与後0-2時間の運動指数比は、control : 0.98 ± 0.17 、VCR 0.075mg/kg : 1.29 ± 0.60 、VCR 0.25mg/kg : 1.48 ± 0.36 、VCR 0.75mg/kg : 1.95 ± 0.21

(mean \pm SE)であった。その後、運動指数比は徐々に低下し、投与6時間後にはcontrolと同様となった。また、VCR 0.75mg/kgによる運動亢進は硫酸アトロピン投与により抑制された。

【まとめ】 VCRは、胃収縮運動を投与直後一過性に亢進させ、この亢進作用はコリン作動性神経を介する可能性が示唆された。

16. 意識下ラットの胃運動に対する endotoxin の影響

群馬大学小児科 群馬県立小児医療センター外科*
渡部登志雄、金子浩章、田端雅彦、友政 剛、高橋 篤*、森川昭廣

【背景】 重症感染症、特に敗血症においては消化管運動異常に基づくと思われる症状がしばしば見られる。また、新生児期に発症する新生児壊死性腸炎で endotoxin は重要な役割を演じているとされる。動物実験においても endotoxin の投与がラットの胃排出を遅延させることが知られている。しかし、その病態生理はあまり明らかにされていない。【目的】 本研究では胃の収縮運動に対する endotoxin の影響を意識下ラットにおいて検討した。【方法】 体重 400 ~ 500g の Wistar 系雄性ラットをネブナルで麻酔し、胃前庭部後壁にフォーストランスデューサー (F08-IS、スターメディカル)を縫着、増幅器を通じてパーソナルコンピューターに接続した。得られた信号は市販のソフトウェアで解析した。術後6日目に endotoxin を尾静脈より静注し、control(0.9% NaCl i.v.)と比較検討した。また、endotoxin による胃運動への影響の機序検索のため atropine と FK1052(5HT-3,4 receptor antagonist)の前処置下に同様の検討を行った。【結果】 endotoxin 1mg/kg 投与群では静注後2分前後より高振幅の収縮波が10分~15分持続し、その後、逆に減衰傾向を示した。一方 control 群では同様の持続する高振幅収縮波は観察されなかった。0.3mg/kg i.v.投与群では1mg/kg 群よりやや振幅の低い波が出現し、その後の減衰は明らかではなかった。endotoxin 投与時の症状としては全例で静注後10分以内に下痢が出現した。その他1例に血便が認められた。また、atropine と FK1052 を前投与した群では endotoxin 1mg/kg を投与しても高振幅波の出現は認められなかった。【まとめ】 endotoxin 1mg/kg の投与は意識下ラットの胃収縮運動を一過性に亢進させるが、その後は抑制する傾向にあった。この収縮波は acetylcholine receptor、5HT receptor を介している可能性が示唆された。

17. 空腹期十二指腸内圧からみた早期胃癌幽門側胃切除術後の病態生理学的検討

日本歯科大学外科*、日本大学医学部第一外科
 富田涼一*、青木信彦、根津 健、藤崎 滋、君塚 圭、野中倫明、五十嵐誠悟、池田
 太郎、萩原紀嗣、越永従道、丹正勝久、宗像敬明、福澤正洋

目的：十二指腸における空腹期強収縮帯 interdigestive migrating motor complex (IMMC), phase III (以下、IMMC-p IIIと略す)の発現の有無別から2群に分け、術後 quality of life (QOL)を比較検討した。対象および方法：早期胃癌幽門側胃切除術 (Billroth I法、D2リンパ節郭清、根治度A) 後症例30例であり、性別は男性18例、女性12例、年齢分布は43-79歳、平均58、9歳である。なお、これらの症例の術後経過は良好で合併症は認めていない。また、術後1年から1年6ヵ月 (平均1年3ヵ月) を経過しており、化学療法等の補助療法は受けていない。そして、精神神経疾患、代謝疾患 (糖尿病、甲状腺機能低下症)、消化器疾患 (non-ulcer dyspepsia, 過敏性腸症候群、慢性便秘症、腸閉塞症) などの既往はない。方法は空腹期十二指腸運動の測定 (force transducer法) と問診 (直接法) を食欲の有無、健常時と比較した1回当たりの食事摂取量、健常時と比較した体重減少量、早期ダンピング症状、逆流性食道炎症状 (胸やけ、逆流感、嚥下困難)、悪心、腹痛、腹部膨満感、腹鳴、下痢などについて行った。成績：1) IMMC-p III陽性群 (20例) では、陰性群 (10例) に比較して明らかに食欲が有り食事摂取量も多く、体重減少が少なかった。2) IMMC-p III陽性群では、陰性群に比較して明らかに早期ダンピング症状 (全身症状)、逆流性食道炎症状 (胸やけ、逆流感、嚥下困難など)、悪心、腹痛、下痢、腹部膨満感、腹鳴などが少なかった。結語：IMMC-p III陽性群では陰性群に比較して、術後QOLは良好であった。よって、IMMC-p IIIを発現させる消化管運動機能改善薬を投与すれば、種々の腹部症状を改善させ胃切除術後のQOL向上に役立つものと思われる。

18. 十二指腸内capsaicinの空腹期消化管運動に対する効果

東北大学第一外科
 柴田 近、佐々木巖、内藤広郎、上野達也、松野正紀

capsaicinは唐辛子の辛みの主成分であり、知覚神経末端に作用することが知られている。capsaicinを胃内に投与すると神経反射により上部消化管と結腸の運動が亢進することをわれわれは以前に報告した。〈目的〉capsaicin十二指腸内投与のmigrating myoelectric complex (MMC)、血中motilin濃度に対する効果を検討すること。〈対象と方法〉雑種成犬4頭を用い、胃体部、胃前庭部、十二指腸、空腸の4ヶ所で消化管運動が測定できるようにstrain gauge force transducerを縫着し、十二指腸内投与用のシリコンチューブを挿入、固定した。2週間の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MMCが出現することを確認し、MMCのphase III (強収縮) が胃体部で起こってから5-10分後にcapsaicin 0, 1, 2, 5, 10 mgを10分間かけて十二指腸内に投与した。MMCのphase I (静止期) の時期にmotilin 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{h}$ を30分間静脈内投与し、motilin投与開始10分後からcapsaicin 0, 1, 5, 10 mgを10分間かけて十二指腸内に投与した。capsaicin投与中の血中motilin濃度をRIAにて測定した。〈結果〉十二指腸内capsaicinは自然に起こるMMCのphase IIIを胃で用量依存性に抑制した。十二指腸、空腸では抑制効果は認められなかった。また、血中motilin濃度は十二指腸内capsaicinにより抑制された。十二指腸内capsaicinはmotilinにより誘発されたphase IIIを胃で用量依存性に抑制したが、血中motilin濃度には影響しなかった。十二指腸、空腸では抑制効果は認められなかった。〈結語〉十二指腸内capsaicinは主として胃のphase IIIを神経反射により抑制したことから、十二指腸粘膜内のcapsaicin感受性神経が胃のphase III制御に関与している可能性が示された。

19. 腸管筋電図解析による消化管運動生理に関する実験的研究

山梨医科大学第二外科、新潟大学小児外科※

高野邦夫、大矢知昇、荒井洋志、毛利成昭、宮原和弘、羽田真朗、腰塚浩三、多田祐輔、
八木 実※、岩淵 真※

消化管運動生理の調節およびその障害のメカニズムの解明、手術後の消化管運動の変化および薬剤投与による効果を明らかにするため、我々は動物を用いて実験的に腸管運動を筋電図学的に解析して研究を行ってきた。当初ヒトに近似した腸管の生理運動や薬理反応を期待しうる適切な実験動物としてイヌを用いて研究を行ってきたが、最近の実験動物使用の環境の変化により、実験動物をラットに変更し研究を継続している。我々の消化管運動生理に関する研究から興味ある結果を報告するとともに、ラットを用いた腸管運動の解析の有用な点と問題点を明らかにして、今後の消化管運動機能研究の一手段となりうるか否かを文献的考察を含めて検討したい。【対象と方法】SDラット150~200gを用いてコントロール群とともに小腸切除、回盲部切除、胆管結紮、vagotomyなどの操作を加えた実験モデルを作成するとともに、胃瘻造設により薬剤を投与してその効果も比較検討した。我々がラット用に特別に開発した極小の銀針双極電極を胃前壁、十二指腸および空腸・回腸に逢着して、電極コードは腹壁より皮下を通して背側頸部より外界に誘導してアンプに接続した後、意識下に腸管運動を導出記録した。筋電図学的にはBER放電頻度、腸管収縮の持続時間とその発生間隔およびその伝播様式などを比較分析するとともに、イヌでの分析結果と比較検討した。【結果】ラット腸管運動の筋電図記録を解析すると、周期的に収縮運動が認められ、その発生間隔は約15分、持続時間は2~6分であった。また、腸管収縮の肛門側腸管への伝播が認められたが、ヒトやイヌ比べ収縮運動の周期が早く詳細の分析は困難で、特に腸管運動をPhase I~IVに明確に区別し得なかった。【考察と結語】ラットを用いた消化管運動生理に関する実験的研究は、種の特異性もあり未だヒトにおけるモチリン様の物質が発見されていないことなど今後研究を進める必要性も多いが、腸管収縮運動を認めその収縮運動が伝播することが明らかとなり、動物の種段や大きさなどは手頃であり、さらに種々の疾患病態モデルが開発されていることから、今後消化管運動生理研究の有用な手段の一つになりうると考えられた。

20. マイクロダイアリシス法を用いた生体下イヌ小腸壁内神経からのアセチルコリン遊離量の測定

長崎大学第2外科、同第2薬理※

蔭本 憲明、古市 哲、川上 俊介、塚本 幹夫、円城寺 昭人、
古井 純一郎、谷山 紘太郎※、兼松 隆之

【背景、目的】消化管運動をつかさどる重要な神経は副交感神経である。副交感神経から遊離したアセチルコリン(ACh)が平滑筋上のムスカリン受容体に結合する事により平滑筋が収縮し消化管運動が亢進することから消化管ホルモン、消化管運動賦活剤等の作用機序の解明にはACh遊離量が指標とされてきた。従来、ACh遊離量の測定はin vitro下に消化管の摘出標本を用いて行われてきたが、得られる結果が必ずしもin vivoにおいて十分に説明出来ないことがあり、in vivoにおける作用機序の解明が必要だと考えられる。そこで、今回我々はマイクロダイアリシス法をイヌ消化管に応用し、生体下におけるACh遊離量の測定を試みた。

【方法】麻酔下においてイヌ小腸壁内筋層に透析プローブを挿入し、同部位にstrain gauge force transducer(SG)を縫着し、ACh遊離量及び消化管運動をそれぞれ高速液体クロマトグラフィー、SGにて測定した。【結果】ACh基礎遊離量は0.677pmol/15minであった。この基礎遊離量はTTX投与(経プローブ投与)により約30%まで減少し、atropine投与(経プローブ投与、動注)により約170%まで増加した。小腸壁に電気刺激を加えたところ、ACh遊離量は増加し同時に強収縮の出現を認めた。TTX,atropineの前投与によりこの強収縮は抑制され、ACh遊離量の増加はTTXの前投与により減少し、atropineの前投与によりさらに増加傾向が認められた。【結語】TTX投与により神経活動が遮断されたためACh遊離量が減少し、atropine投与によりmuscarinic autoreceptorが阻害されたためACh遊離量が増加したと考えられ本法が副交感神経の活動を的確に反映していることが示され、本法は生体下にてACh遊離量を測定する上で有用な方法と考えられた。

21. 術後疼痛緩和を目的とした硬膜外塩酸モルヒネ注投与の腸管運動に対する影響 (血中ホルモン変化の面からも)

豊橋市民病院 外科・肛門科
柴田 佳久

開腹術後の術後疼痛に対して塩酸モルヒネ注の硬膜外投与が有効として汎用されてきている。一方、我々は塩酸モルヒネを硬膜外投与すると腸管に Migrating Motor Complex (MMC) 様の強蠕動波が出現することを報告してきた。今回、塩酸モルヒネにて惹起される MMC の性質と血中ホルモン変動との関係を検討した。(対象と方法) 当院で開腹手術を行った胃癌症例 10 例を対象とした。術中腹部操作終了時に、経鼻的に Drainage 孔を有する 3 重管を上部小腸まで誘導留置し、術直後より infused catheter 法にて小腸運動を連続的に記録した。その間、硬膜外腔への塩酸モルヒネ注入(塩酸モルヒネ 3mg, 生食 5ml)の投与を、術後に MMC が観察され安定した時期に、先の Phase III が終了し次の Phase III が出現するまでの間隔の約 20% の時点で硬膜外カテーテルより投与した。腸管運動の変化とその時期の血中ガストリン・モチリンとモルヒネ濃度を経時的に計測した。(結果) 塩酸モルヒネ投与で新たな Phase III 様の強収縮波(induced-phase III)がみられた。induced-phase III は、Phase III に比べ高振幅(210±30%)、長時間(21.5±1.2分:7.9±0.9分)であった。また、次の強収縮発生までの時間には差はなかった。モルヒネ濃度は投与後 5 分で 43.3±4.5ng/ml(投与前 1.4±0.6)と上昇した。ガストリン値はモルヒネ投与後 5 分から 15 分まで上昇していたが、モチリン値は逆に低下していた。(結語) 塩酸モルヒネ硬膜外投与で小腸に新たな induced-phase III が惹起された。Induced-phase III は通常の Phase III より持続時間も長く高振幅であった。Induced-phase III はモルヒネの直接の薬理作用によると考えられた。

22. 腸間膜動脈神経刺激によるモルモット摘出回腸収縮反応に対するノシセプチンの効果 奈良県立医科大学第二生理学教室、第一外科学教室* 杉森志穂*、門脇 真、米田 諭、山内昌哉*、藤井久男*、中野博重*、高木 都

グアナチジン、ヘキサメソニウム処置下で腸間膜動脈神経の電気刺激(MNS)により生じるモルモット回腸の収縮反応は、知覚神経末端からのサブスタンス P の放出を介するコリン作動性の収縮であり、モルヒネの投与により消失することが報告されている。ノシセプチンはオピオイドペプチドと類似した構造の neuropeptide で、そのレセプターは中枢神経系および消化管、精管、脾臓などの末梢組織に存在している。今回 MNS によるこの回腸収縮反応に対するノシセプチンの効果をメチオニン-エンケファリンと比較して検討した。

【方法】 Hartley 系雄性モルモットの摘出回腸から腸間膜動脈神経をつけて長さ約 3cm の分節を切除しマグヌスバス中に懸垂した。グアナチジン 2 μM、ヘキサメソニウム 50 μM を投与した後に MNS を行い、縦走筋方向の収縮反応をフォーストランスデューサを用いて記録した。MNS による回腸収縮反応に対するノシセプチン(1-100 nM)およびメチオニン-エンケファリン(0.1-10 μM)の効果を検討した。

【結果】 MNS による回腸収縮反応はノシセプチン(1-100 nM)の投与によりそれぞれ control の 59.3 ± 20.6-25.7 ± 13.1% まで濃度依存性に有意に抑制され、メチオニン-エンケファリン(0.1-10 μM)の投与によっても同様に抑制された。またオピオイドのアнтаゴニストであるナロキソンの前投与によりメチオニン-エンケファリンの MNS による回腸収縮反応に対する抑制効果は拮抗されたが、ノシセプチンの効果は拮抗されなかった。

【結論】 ノシセプチンはオピオイドレセプターとは異なるレセプターを介して、知覚神経末端からのサブスタンス P の放出および腸壁のコリン作動性神経からのアセチルコリンの放出の、どちらか一方または両方を抑制しているものと考えられた。

23. 大腸全摘兼回腸肛門吻合術後の QOL 向上をめざした新しい術式の開発-特に ileojejunal transposition を用いた実験的検討

東北大学医学部第一外科

上野達也, 柴田近, 内藤広郎, 大谷典也, 金学林, 舟山裕士, 福島浩平, 佐々木巖, 松野正紀

【背景】潰瘍性大腸炎の根治的治療として大腸全摘兼回腸肛門吻合術(IAA)が広く行われるようになってきた。しかし、大腸機能の喪失による激しい下痢や脱水のため QOL が損なわれることも多く、臨床上的問題となっている。一方、我々はこれまで Ileo-jejunal Transposition(IJT)を考案、検討し、その結果 IJT では小腸粘膜の肥厚と上部消化管運動の抑制が見られることを見いだした。【目的】IJT が IAA 後の QOL を向上させるか否かについて、主として消化管運動の面から検討する。【対象及び方法】雑種成犬を用い大腸全摘術を施行し、これを回腸末端部 60cm を空腸起始部に間置した後回腸囊直腸吻合を施行する群 (IJT 群)、空腸起始部より 15cm 及び 75cm 肛門側の空腸を切離再吻合した後回腸囊直腸吻合を施行する群 (TS 群)、および消化管手術非施行群(control 群)に分けた。各群は Strain gauge force transducer を縫着し消化管運動を測定する犬と Freeze-Drying Method による胃排出時間(GE)を測定する犬にわけた。4 週間の回復期間の後、消化管運動、GE、体重変化、便中水分含有率(WOS)の変化を測定し検討した。【結果】(1)術前術後の体重変化では、術前の体重を 100 とした場合 IJT 群で 75.5、TS 群で 82.3 と差は認めなかった。(2)WOS は IJT 群(82±1%)が TS 群(85±2%)に比して有意に低値を示した($p<0.05$)。(3)GE は、液体では両群に差は認めないが、固体では IJT 群(T1/2: 212±10分)は TS 群(T1/2:147±10分)や control 群(T1/2:143±12分)に比して延長した。(4)消化管運動では、食後期の長さは IJT 群(10.4 時間)が TS 群(8.3 時間)より延長し、腸内容の輸送に関わる MMC 伝播速度は、IJT(2.4cm/min)と TS 群(2.2cm/min)で差は認めず、MMC の周期は IJT 群(80分)と TS 群(81分)が control 群(112分)に比べ短縮した。【結語】IAA に IJT を付加することで、固体の胃排出時時間は延長し、WOS も減少したことから、IJT を付加することで IAA 後の QOL が向上する可能性があると考えられた。

24. 病態生理学的検討を行った小児食道アカラジアの 1 例

名古屋大学小児外科、*同解剖学第一講座

渡辺芳夫、安藤久實、瀬尾孝彦、鳥橋茂子*

小児期の食道アカラジアは稀な疾患であり、病態生理に関して不明な点が多い。私共は 6 歳男児の食道アカラジア症例(以下本例)を食道内圧と組織学的検査より検討した結果、興味ある所見が得られたので報告する。**症例**：6 歳男児；[現病歴] 1 年前から食事直後に嘔吐を繰り返すようになり、胃食道逆流症の疑いで紹介された。[生理学的検査] 食道透視にて、食道の拡張は軽度であったが、胃食道接合部の通過不全と食道壁の不規則な収縮を認めた。下部食道 3 点(下部食道括約筋部にデントスリーブ、食道体部の 2 点をサイドホール)の同時内圧測定を持続的に行い、嚥下による食道体部にの同時性収縮と下部食道括約筋部の弛緩不全を認めた。[免疫組織] 手術時に下部食道から得た食道筋層を c-Kit、PGP9.5、N-NOS、U-NOS、シナプス開口分泌関連蛋白を用いて免疫染色し、成人の食道癌患者から得た正常下部食道と比較した。本例の食道の筋層間神経叢および筋層では PGP9.5、N-NOS、U-NOS、シナプス開口分泌関連蛋白のすべてが減少し、特に、N-NOS、U-NOS の減少が著明であった。一方、c-Kit 陽性細胞は比較的保たれていた。さらに、U-NOS と c-Kit の 2 重染色によって、両者の局在を検討してみると、正常下部食道の組織では c-Kit 陽性細胞周囲に多くの U-NOS 陽性線維の集積を認めたが、本例では c-Kit 陽性細胞の周囲に U-NOS 陽性線維を認めなかった。**まとめ**：小児期には稀な食道アカラジアを経験した。食道内圧検査にて嚥下による食道体部の同時性収縮と下部食道括約筋の弛緩不全という特徴ある所見がえられた。免疫組織学的に NOS 陽性神経が著明に減少しており、非アドレナリン性・非コリン性抑制神経の障害、特に、c-Kit 陽性細胞に対する作用の障害が食道アカラジアの病態に強く関与するものと考えられた。

25. 実験的炎症によるイヌ回腸輪状筋細胞のCa²⁺動員異常

長崎大学第2外科¹⁾、Wisconsin医科大学外科²⁾
 入江 真^{1) 2)}、塚本幹夫¹⁾、円城寺昭人¹⁾、兼松隆之¹⁾
 X.Z. Shi²⁾、S.K.Sarna²⁾

目的：実験的炎症における回腸輪状筋の収縮能低下が細胞外よりのCa²⁺流入の変化によるものか、或いは1, 4, 5-イノシトール三リン酸(IP3)感受性プールよりのCa²⁺遊離の変化によるものかについて検討した。**実験方法：**酵素処理により単離したイヌ回腸輪状筋細胞を用いた。ACh, KCl, Bay K 8644 をアゴニストとして、また、ベラパミルをCa²⁺チャンネルブロッカーとして用いた。細胞内Ca²⁺プールの枯渇させる目的でthapsigarginを用いた。45Ca²⁺を用いて細胞内プールからのCa²⁺遊離を測定した。また、IP3レセプターをブロックする目的でサポニン処理細胞に低分子量ヘパリンを用いた。**結果：**炎症によりAChに対する収縮は有意に抑制された。1 μMにおいて、正常及び炎症細胞の収縮はそれぞれ24±1%、12±1%、(n=11, 12, p<0.05)であった。KCl (50mM)による収縮も24±3%から7±1%に抑制された(n=5, 4, p<0.05)。同様に、Bay K 8644 (1 μM)による収縮も16±2%から9±1%に抑制された(n=5, 6, p<0.05)。ベラパミル投与あるいは細胞外Ca²⁺濃度を下げる事により、正常、炎症細胞とも濃度依存性に収縮が抑制された。Thapsigargin処理によりAChの反応は有意に抑制された(正常細胞にてACh 1 μMに対し21±2% vs. 4±2%、炎症細胞にて13±1% vs. 4±1%、n=4, P<0.05)。しかし、ACh (1 μM)及びIP3 (1 μM)に対する細胞内プールよりのCa²⁺遊離には差が無かった(正常細胞でそれぞれ19±3%、13±4%、n=3, 炎症細胞で18±3%、16±4%、n=5)。ヘパリン(100 μg/ml)によりACh (1 μM)の収縮は正常細胞で84±6% (n=3)、炎症細胞で88±15% (n=4)抑制された。IP3 (1 μM)に対する収縮反応は正常、炎症細胞で差がなかった(13±2% vs. 12±3%、n=3, 4)。**結論：**炎症時の収縮能低下はIP3感受性プールからのCa²⁺遊離の変化ではなく、細胞外からのCa²⁺流入減少が関与すると考えられた。

26. 熱ストレスに対する拘束ラットの血圧ゆらぎと動脈組織のカテコールアミン含量の変化

秋田県立脳血管研究センター*、秋田大学工学資源学部**
 猪又 八郎*、井上 浩**

我々は熱ストレスに対するラットの自律神経活動について、心拍・血圧ゆらぎのパワースペクトル解析により検討し、副腎性よりも交感神経性関与の優位性を指摘した。本実験は、この末梢効果を検証するため、血管組織のカテコールアミン含量の変動を調べ、輸精管組織の変動と比較した。**〔方法〕**ウレタン麻醉下のラット(SD、11~15週令、雄)を使用し、心電図および大腿動脈のカテーテルによる観血的血圧を測定した。直腸温(T_r)は赤外線照射と温水還流による全身加温で38℃から42℃まで上昇させた。血圧波形から収縮期血圧(SBP)と拡張期血圧(DBP)を抽出し、1分間毎にパワースペクトル解析を行った。血管組織のカテコールアミン含量は加温前後のそれぞれの左右大腿動脈の切片を摘出、以下生化学的処理によりアドレナリン(Ad)、ノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)の3分画濃度を測定した。**〔結果〕**すでに我々は心電図R-R間隔が直腸温38℃より42℃に上昇により短縮し、スペクトル解析により高周波成分(HF: 1.6 Hz)の消失に対して、低周波成分(LF: ~0.2 Hz)の増強が認められた。一方、血圧については、SBP、DBP両者のゆらぎパワースペクトルはR-Rゆらぎパワースペクトルにほぼ近似し変化した。しかし、LFとHFのピーク値の比(LF成分/HF成分)の評価では、血圧とR-Rゆらぎパワーの変化に違いが認められた。一方、輸精管、大腿動脈両筋組織の内因性カテコールアミン含量のT_r=38℃と42℃下の濃度を測定した。輸精管(n=9)ではAd、NA、DAの各濃度は0.07±0.06、13.4±4.0、0.86±0.52 μg/gであり、大腿動脈(n=3)ではT_r=38℃下ではAd、NA、DAの各濃度は4.1、714、3.9 ng/gの値を示したが、42℃下では両筋組織共3分画中NA濃度の上昇が大きく40%の増加を示した。

27. 動脈硬化病変に対するキトサンの効果：高コレステロール血症（KHC）ウサギを用いて

島根医科大学動物実験施設
権田辰夫、吾郷昭夫

キトサンはエビ、カニ等の甲殻類の殻に由来する動物性食物繊維である。これまでの実験でキトサンは高血圧ラット（SHR）の血圧降下作用と血中コレステロール値を低下させ、脳卒中易発症ラット（SHR-SP）の脳卒中発症を遅延させる作用を有することを報告してきた。本実験では、キトサンの給与が高コレステロール血症ウサギ（KHC）の動脈硬化病変に及ぼす影響を検討した。

〔材料と方法〕2ヶ月齢のKHCを1群5匹の対照群、低分子キトサン群（分子量約1万、山陰建設工業）と高分子キトサン群（分子量約15万、甲陽ケミカル）の3群に分けた。対照群の餌はクレアのウサギ標準食CR-3を与え、キトサン群はCR-3に低分子、高分子キトサンをそれぞれ4%添加した餌を与えた。実験期間は24週間で体重は毎週測定し、3週間毎に血中コレステロール値と中性脂肪値を測定した。

〔結果〕実験開始時のKHCの体重は約2kgで、血中コレステロール値は約800mg/dl、血中中性脂肪値は約400mg/dlであった。キトサンを投与すると、体重の変化は対照群と比較し特に差はみられなかったが、血中コレステロール値と中性脂肪値に低下傾向がみられた。実験終了後に解剖し、大動脈を比較すると対照群では大動脈弓、胸大動脈、腹大動脈に及ぶ高範囲の内膜面に脂肪沈着が著明に認められたが、高分子キトサン群では大動脈弓および肋間動脈分岐部に局限して脂肪沈着が認められるのみであった。低分子キトサン群は両者の中間の成績であった。

〔結語〕以上の結果より、キトサンには動脈硬化病変の進行を抑制する作用が有ることが考えられたが、特に高分子キトサンの作用が強いことがわかった。

28. 消化管平滑筋のNANC伝達物質NOによる過分極活性化電流の増強効果

九州大学医学部薬理学教室
柳田展江、井上隆司、伊東祐之

前回我々は、消化管平滑筋自動能における過分極活性化電流（ I_h ）の重要性を報告した。この電流は種々の内因性物質によって制御されていることが知られている。そこで今回我々は、消化管平滑筋の I_h 電流に及ぼす自律神経を介した調節の可能性に着目し、いかなる制御を受けているか検討した。

モルモット回腸より平滑筋細胞を酵素的に単離し、ナスタチン穿孔型パッチクランプ法を適用し、傾斜上昇電位（-120～-40mV, 63.75s）によって活性化される I_h 電流について、NO及び膜透過型cGMPアナログ（dibutyl cGMP、8-Br-cGMP）の効果について検討した。 I_h 電流の活性化曲線は、NO供与体であるSNAP（10 μ M）や8-Br-cGMP（1mM）によって5～10mV右方移動した。この効果は、PKG阻害薬であるKT5823（1 μ M）存在下においても認められ、その活性化曲線の右方移動に有意な変化は観察されなかった。即ち、消化管平滑筋でみられる I_h 電流においては、NO及び細胞内cGMPはリン酸化を介さず、 I_h 活性化曲線を右方移動させると考えられた。更に、微小電極法を用いて、この I_h 電流の増強効果が膜電位に及ぼす影響について検討した。10 μ M SNAPにより膜電位は、K⁺コンダクタンスを誘発する効果によって過分極を引き起こしたが、wash outによって膜電位が対象レベルに復帰した直後は、slow wave とその上に重畳するCa²⁺ spikeの頻度が一過性に上昇した（反跳現象）。また単一細胞の結果から、SNAPの I_h に対する効果はwash out後もしばらく残存することから、この反跳現象には I_h の活性化が関与している可能性が考えられた。

29. マウス消化管における NANC 性弛緩のメディエーター

大阪府大・獣医薬理、¹大阪府立看護大・医療短期大学部
佐藤友治¹、山崎安子、竹内正吉、畑 文明

ラット消化管の NANC 性弛緩のメディエーターについては、多くの研究があるが、マウスについては限られた報告に留まっている。今回、ICR マウス腸管各部位の NANC 性メディエーターについて検索した。【方法】ICR マウス（8 週齢、両性）から得た空腸、回腸、近位および遠位結腸条片の縦走筋方向の運動を、等張性にマグナス法で記録した。経壁電気刺激（EFS; 10Hz, 10s, 30V）による弛緩に対する、阻害薬の効果を調べた。10 μ M NG-nitro-L-arginine (L-NOARG) で抑制され、1 mM Arginine で回復する弛緩を Nitric oxide (NO)-mediated component, また、3 μ M VIP₁₀₋₂₈, 3 μ M PACAP₆₋₃₈ で抑制される弛緩をそれぞれ VIP-, PACAP-mediated component とした。【結果】① NO-mediated component は調べた全部位で認められ、回腸では 80% を越えた。② VIP-mediated component は空腸と近位結腸で認められた。③ PACAP-mediated component は近位および遠位結腸で認められた。④ 空腸での EFS による弛緩は L-NOARG と VIP₁₀₋₂₈ 処置によりほぼ完全に抑制された。また、近位結腸では L-NOARG, VIP₁₀₋₂₈, PACAP₆₋₃₈ 処置により、遠位結腸では L-NOARG, PACAP₆₋₃₈ 処置によりほぼ完全に抑制された。【考察】ICR マウス腸管縦走筋の弛緩のメディエーターは、空腸では NO と VIP、回腸では NO、近位結腸では NO, VIP, PACAP、遠位結腸では NO と PACAP であることが示唆された。

Component	Jejunum	Ileum	Proximal colon	Distal colon
NO-mediated (%)	62.5±11.5(4)	83.8±5.6(4)	40.5±12.5(8)	54.0±8.1(4)
VIP-mediated (%)	35.5±7.0(4)	0(9)	30.3±5.7(9)	8.0±3.4(6)
PACAP-mediated (%)	0(3)	0(3)	34.3±4.5(6)	30.3±6.8(7)

30. ラット消化管での NANC 性弛緩における Neurotensin の役割

太田麻由子、山路みちる、竹内正吉、畑 文明（大阪府大・獣医薬理）

私達はラット消化管の調べた全ての部位で、幼若齢では一酸化窒素が弛緩をメディエイトしていること、その関与が発育とともに減弱することを報告した。また遠位結腸では VIP と PACAP が働いていることも報告した。本実験では空腸、回腸での一酸化窒素以外のメディエーターについて検索し、Neurotensin (NT) の役割を確認したので報告する。【方法】2、4、8 週齢の Wistar ラットから得た空腸、回腸条片の縦走筋方向の運動を、等張性にマグナス法で記録した。経壁電気刺激（EFS; 10Hz, 10s, 30V）による弛緩と、外から適用した薬物による弛緩を記録した。【結果】4 および 8 週齢ラットの空腸および回腸 ① EFS により生じた弛緩は α -Chymotrypsin 処置により、約 50% 抑制された。② 外から適用した NT により弛緩を生じ、さらに反復適用により脱感作が生じた。脱感作により EFS による弛緩は約 50% 抑制された。③ NT receptor antagonist の SR48692 により、EFS による弛緩は約 40% 抑制された。④ NT による弛緩は Apamin により著しく抑制されたが、Charybdotoxin では影響されなかった。また、Tetrodotoxin によっても影響されなかった。⑤ EFS による弛緩は VIP と PACAP antagonist では影響されなかった。⑥ EFS による弛緩は Apamin により著しく抑制された。2 週齢ラットの空腸および回腸 ① α -Chymotrypsin 処置により EFS による弛緩は著しく増強された。② 外から適用した NT により収縮を生じた。この収縮は Atropine、Apamin および Tetrodotoxin によって影響されなかったが、SR48692 により著しく抑制された。③ SR48692 により、EFS による弛緩は増強された。【考察】NT は 4 および 8 週齢ラットの空腸および回腸において、NANC 性弛緩のメディエーターとして Apamin sensitive K⁺ channel の開口を介して働いていることが示唆された。一方、2 週齢では、興奮性メディエーターとしての働きが示唆された。

31. ラット遠位結腸での NANC 性弛緩における、VIP の役割の発育にともなう変化
 大阪府大・獣医薬理、¹ 岐阜大大学院・連合獣医
 竹内正吉、根来 有、山崎安子、畑 文明、武脇 義¹

私達は以前に Wistar ラット消化管での、NANC 性弛緩のメディエーターとしての一酸化窒素の役割が、ラットの発育と加齢にともなって著しく減弱することを報告した。本報告では、Wistar ラット遠位結腸での、VIP と PACAP の NANC 性弛緩のメディエーターとしての役割と、その発育にともなう変化を調べた。【方法】2-50 週齢の Wistar ラットから得た遠位結腸条片の縦走筋方向の運動を、等張性にマグナス法で記録した。経壁電気刺激 (EFS; 10Hz, 10s, 30V) による弛緩と、外から適用した薬物による弛緩を記録した。また、縦走筋細胞の膜電位変化を細胞内微小電極法により記録した。【結果】①VIP の NANC 性弛緩のメディエーターとしての役割を、VIP アンタゴニストの VIP₁₀₋₂₈ を用いて調べたが、その関与は 2 週齢では殆ど確認できず、4 週齢では 18%、8 週齢では 36%、20 週齢と 50 週齢では 67% に増加した。②どの週齢においても、低頻度刺激による弛緩における VIP の関与の程度は高頻度刺激のものとは変わらなかった。③外から適用した VIP に対する遠位結腸縦走筋の感受性は、2 週齢で最も高く、その後発育にともない低下した。④PACAP アンタゴニストの PACAP₆₋₃₈ は、EFS による弛緩をどの週齢でもおよそ 40% 抑制した。⑤EFS (2-5 pulses) により縦走筋細胞で生じた i.j.p. において、4 週齢までは VIP-mediated component は確認できなかった。しかし、8 週齢では 25 例中 15 例で、50 週齢で 28 例中 18 例で VIP-mediated component が確認された。外から適用した VIP により、2 週齢では膜電位に変化を与えなかったが、4 週齢では 2.1 mV、8 週齢では 7.6 mV、50 週齢では 7.0 mV の過分極を生じた。【考察】遠位結腸の NANC 性弛緩のメディエーターとしての VIP の役割はラットの発育とともに増大し、これは以前報告した一酸化窒素の役割が減弱するのとは対照的であった。一方 PACAP の役割に発育による変化はとくにみられなかった。

32. ラット回腸運動に対する ATP による外来神経性抑制性支配

奈良県立医科大学・医・第二生理
 門脇 真, 米田 諭, 高木 都

【目的】腸管運動は主に内因性の腸管神経系に支配されているが、外来性の神経にも大きな影響を受けている。しかしながら、これらの外来性の神経は直接平滑筋には投射せず、腸管神経系とシナプス結合して神経を交替した後、平滑筋に分布する。そこで、外来神経刺激による回腸縦走筋の弛緩反応は、どのような神経により調節されているかについて検討した。

【方法】ラットの長さ約 2cm の腸間膜動脈神経一回腸標本を作製してマグナスバス中に懸垂し、縦走筋方向の運動を記録した。腸間膜動脈神経刺激は 5 分間隔で 10Hz、0.5msec の矩形波により最大反応を誘起した電圧で 30 秒間行った。栄養液は atropine を 1 μ M 含む HEPES・Tyrode 液を用いた。

【結果】腸間膜動脈神経の電気刺激により guanethidine 感受性の弛緩反応 (papaverine 弛緩の約 70%) が見られ、これは C6 (100 μ M)、capsaicin (1 μ M)、L-NAME (100 μ M) により影響を受けなかったが、ATP による脱感作 (100 μ M \times 4) により 68% 有意 (P<0.01) に抑制された。このうち、4/11 例では 80% 以上の強い抑制が見られたが、反対に 4/11 例では 50% 以下の抑制しか示さず、ATP に強く依存する成分とあまり依存しない成分が混在することが示唆された。さらに、ATP に強く依存する弛緩反応は reactive blue-2 (50 μ M) および apamin (0.5 μ M) によってそれぞれ 88% および 79% 有意 (P<0.01) に強く抑制された。また、外因性に投与した ATP により 1 μ M で弛緩 (papaverine 弛緩の約 40%)、100 μ M で収縮という異なった反応が見られ、ATP による弛緩反応は高親和性の受容体を介する TTX 非感受性の反応であった。

【結論】ラット回腸において、交感神経は壁内神経叢で神経を交替し、一部は ATP 作動性の運動神経を介して抑制性の神経支配を行っていると考えられる。

33. ラット門脈輪状筋標本における L-nitroarginine の効果について

近畿大学 高血圧研究所¹、薬学部機能形態²

島村佳一¹、鄒 莉波²、松田恭子²、関口富美子²、山本和夫¹、砂野 哲²

ラットの肝臓の循環調節には一酸化窒素 (NO) が関与していることが示唆されている。しかし摘出した門脈標本縦走筋においては内皮由来 NO の収縮調節への関与は否定的である。今回われわれは摘出門脈輪状筋標本において内皮由来 NO の収縮調節への関与を検討した。

16週齢の雄性 Wistar Kyoto ラットからエーテル麻酔下に門脈を摘出し、輪状筋標本を作成した。等尺性収縮を37°Cの modified Tyrode's 液中で記録した。内腔面を上にした標本において、平滑筋の膜電位を微小電極法で記録した。

内皮正常標本とは異なり、律動性自発収縮を示さず安定な張力を示した。L-nitroarginine を作用させると緊張性収縮を発生し、この収縮は L-arginine、nifedipine、Ca無添加 Tyrode's 液、sodium nitroprusside によって抑制された。内皮除去標本では L-nitroarginine を作用させても収縮を発生しなかった。膜電位記録では低頻度の散発的な活動電位の発生が観察された。L-nitroarginine は活動電位発生数を増加させた。sodium nitroprusside は活動電位数を減少させた。

以上よりラット門脈輪状筋において L-nitroarginine は内皮由来NO生成の抑制によって収縮を発生させ、その機序には活動電位の増加が関与していると考えられる。

34. 尿道平滑筋の弛緩反応に対する nitric oxide (NO) の役割

熊本大学医学部 泌尿器科学教室、微生物学教室*

吉田正貴、稲留彰人、米納 誠、瀬下博志、宮本 豊、村上滋孝、上田昭一、赤池孝章*、前田 浩*

【目的】尿道平滑筋の弛緩反応の神経伝達物質は nitrergic nerve から放出されるとされているが、その作用が radical NO あるいは NO-containing compounds によるものかについては未だ明らかにされていない。また NO はさまざまな神経伝達物質の放出も制御しているとの報告もある。今回我々は、radical NO の消去剤である carboxy-PTIO を用いて尿道平滑筋の弛緩反応と尿道の adrenergic nerve からの noradrenaline 放出量に対する radical NO の役割について検討した。【方法】雌家兎より作成した尿道の平滑筋条片を筋浴槽内に懸垂固定して、張力変化を等尺性トランスジューサーにて記録した。1 μM phenylephrine で前収縮させた平滑筋条片に対する cys-NO (0.1 μM - 1 mM) および経壁電気刺激 (EFS: 最大下電圧、2 msec、0.5-15 Hz) による弛緩反応を観察した。さらに平滑筋条片に臓器透析用プローブを刺入し Ringer 液を還流し EFS 時の透析液を microdialysis 法にて回収し、透析液中の noradrenaline 濃度を電気化学検出器つき HPLC にて測定した。弛緩反応と noradrenaline 放出量に対する carboxy-PTIO と L-NNA の作用について検討した。【結果】Cys-NO および EFS は家兎尿道平滑筋を濃度または周波数依存性に弛緩させた。Carboxy-PTIO は cys-NO による容量作用曲線を有意に抑制したが、L-NNA は影響を及ぼさなかった。L-NNA は EFS による弛緩反応をほぼ完全に抑制したが carboxy-PTIO の抑制率は約 45%であった。EFS により尿道から noradrenaline が放出され、この放出量は carboxy-PTIO の前処置により有意に増加した。また carboxy-PTIO と L-NNA 両者の前処置にてもその増加量は carboxy-PTIO 単独の時と同様であった。【結論】家兎尿道の弛緩反応には radical NO だけでなく NO-containing compounds も関与しており、さらに nitrergic nerve より放出された radical NO は adrenergic nerve からの noradrenaline の放出に対して抑制的に作用していることが示唆された。

35. 前立腺を標的とした α_1 遮断薬の生体内 α_1 受容体結合動態

静岡県立大学薬学部薬剤学教室
山田静雄、黄倉 崇、當摩紋子、木村良平

α_1 遮断薬が前立腺肥大症に伴う排尿障害の治療薬として臨床応用されて以来、血管よりも前立腺の α_1 受容体に選択性を有する α_1 遮断薬の開発が進められてきた。ところで α_1 遮断薬の受容体結合特性については、*in vitro*で詳細に検討されているが、生体内での臓器選択性は明らかでない。本研究では新規 α_1 遮断薬のKMD-3213 (KMD) 並びにJTH-601 (JTH) をラットに経口または静脈内投与し、生体内 α_1 受容体結合動態について検討した。

ラットにKMD (0.2~20.2 $\mu\text{mol/kg}$) を経口投与後0.5~24時間において、標識リガンドとして $[\text{^3H}]$ -プラゾシン (Pra) を用いるラジオレセプターアッセイ法により各臓器 α_1 受容体を測定したところ、前立腺と顎下腺への $[\text{^3H}]$ Pra 結合の最大結合部位数は、その投与量に依存して対照値に比べ有意に減少したが、脾臓及び大脳皮質では変化がなかった。JTH (21.8 $\mu\text{mol/kg}$) では各臓器で $[\text{^3H}]$ Pra 結合の解離定数の増加がみられ、この増加は前立腺で持続した。KMD、JTH 及び Pra とともに $[\text{^3H}]$ -タムスロシン (Tam) を静脈内投与し、各臓器への $[\text{^3H}]$ Tam の特異的結合を測定した。各臓器の $[\text{^3H}]$ Tam 結合は、KMD、JTH 及び Pra の投与により用量依存的に抑制された。これより算出した各 α_1 遮断薬の抑制効力 (ID_{50}) から、大動脈に対する前立腺の α_1 受容体への選択性は Pra より KMD で17倍、JTH で6倍高いことが示された。 $[\text{^3H}]$ KMD の静脈内投与による *in vivo* での特異的結合は、前立腺と顎下腺で高く持続的であったが、大動脈と脾臓では極めて低値であった。また、 $[\text{^3H}]$ JTH の特異的結合は大動脈では認められなかった。

以上の結果から、KMD と JTH は生体内において大動脈より前立腺の α_1 受容体に選択的に結合することが明らかとなった。

36. ディスパーゼ[®]による気管平滑筋細胞単離

日本大学医学部生理学教室
山下俊一、王瑞霞、國分眞一郎

他の平滑筋組織と比較し、気管平滑筋では酵素処理による細胞の単離が難しい。従来、この目的のためにはコラゲナーゼ、エラスターゼ混合液が用いられてきたが、酵素のロットによって収率が安定しない問題があった。我々は最近、エラスターゼの代わりにディスパーゼ[®]を用いてモルモットおよびブタ気管平滑筋細胞の分散を行い¹⁾、安定した成績が得られたので報告する。

モルモット気管平滑筋細胞に1 μM アセチルコリン (ACh) を投与して観察される最大短縮時の長径は、エラスターゼ群、ディスパーゼ群で、それぞれコントロールの $82.3 \pm 4.2\%$ ($n=19$)、 $68.9 \pm 5.5\%$ ($n=19$)であり、ディスパーゼ群の方が有意に短縮した。L-Type Ca^{2+} 電流の最大値には両群間で差が認められなかったが、1 μM AChによりこの電流を持続的に抑制すると、エラスターゼ群、ディスパーゼ群で、それぞれコントロールの $78.5 \pm 3.8\%$ ($n=10$)、 $69.3 \pm 2.9\%$ ($n=10$)となり、ディスパーゼ群が有意に強く抑制された。ブタ気管平滑筋細胞に10 μM AChを投与して観察される非選択的カチオン電流の最大値は、エラスターゼ群、ディスパーゼ群で、それぞれ $31.7 \pm 6.4 \text{ pA}$ ($n=15$)、 $52.6 \pm 5.8 \text{ pA}$ ($n=15$)であり、ディスパーゼ群が有意に大きかった。これらの方法で分散したブタ気管平滑筋細胞の表面を走査型電子顕微鏡で観察したが、差は認められなかった。以上の結果は、ディスパーゼにより単離した細胞の方がエラスターゼを用いたものよりAChに対して強く反応することを示しており、より生理的な機能が維持されていることが示唆される。

1) Yamashita, T. and Kokubun, S. (1997). J. Smooth Muscle Res. 33: 175-185

37. 受容体作動薬投与による妊娠子宮平滑筋のPKC活性およびgap junction数の経時的変化

東京慈恵会医科大学産婦人科

齋藤絵美、大浦訓章、中野 真、落合和彦、田中忠夫

(目的) 妊娠末期の強大な子宮筋収縮のメカニズムの1つにPI-responseによるCa感受性の亢進がある。受容体作動薬投与によってPKC活性が上昇、Ca感受性が亢進する。このPKC活性の上昇が、*in vitro*の系においてgap junction数を増加させるとの報告がされている。今回、妊娠各時期に受容体作動薬を投与し、PKC活性とgap junction数を経時的に計測。*in vivo*系におけるPKC活性とgap junction形成について考察した。(方法) Wistar系ラットに対して、未妊娠、妊娠7日目、20日目にoxytocin(OT)、PGF2 α を腹腔内に投与。投与30分、1時間、4時間、12時間に子宮筋を摘出。PKC活性は細胞質、細胞膜成分に分けモノクローナル抗体2B9を用いELISA法にて測定。gap junction数は電顕的にカウントするとともに、connexin43をRT-PCR法にて特異マーカーを用い発現の状態を観察した。(成績) OT投与群では、未妊娠、妊娠7日目にPKC活性の変化は無く、妊娠20日目では、細胞膜において、投与30分~1時間にかけて上昇。4時間を過ぎると有意な上昇は無かった。gap junction数は電顕所見では、未妊娠、妊娠7日目では増加せず、妊娠20日目では投与1時間以降に増加した。しかし、RT-PCR法によるconnexin43の発現は、妊娠7日目にもみられ、妊娠20日目では、投与1時間で最も発現の上昇を認めた。PGF2 α 投与群では、各群において、投与30分より細胞膜のPKC活性は上昇する傾向が認められた。また、gap junction数の増加、およびconnexin43の発現の上昇も各群において、投与1時間から4時間にかけて認められた。(結論) 受容体作動薬の種類によって、PKC活性の亢進、gap junction数の増加に时期的な相違がみられた。また、PKC活性の亢進が認められたときにgap junction数が増加していることより、*in vivo*の系においても両者に関連があるが、各々の発現には時間差があり、PKC活性の亢進の結果による子宮筋収縮や、second messengerを介し、gap junction数が増加する可能性が示唆された。

38. 血管平滑筋におけるインターロイキン1受容体を介した誘導型NO合成酵素発現におけるNF- κ Bの核内移行及びProtein kinase Cの活性化の役割

徳島大学薬学部薬理学教室

久山 哲廣、猪本 美佳、日置 由佳理、福井 裕行

インターロイキン1 (IL-1) は種々の難治性炎症性疾患の発症・維持に深く関与するとされ、広汎な生理活性作用を有する炎症性サイトカインの一つである。我々は以前血管平滑筋細胞 (RASM) において誘導型NO合成酵素 (iNOS) が発現することを見出したが、このiNOSや誘導型シクロオキシゲナーゼ (COX-II) の発現はIL-1によって引き起こされることが、現在広く知られている。本研究ではiNOS遺伝子発現に重要とされる転写因子NF- κ Bの活性化(核内移行)とPKCの関わりについて検討を加えたので報告したい。

PKC α に対するantisense-oligodeoxynucleotide (AS-PKC α)をRASMにtransfectionし、PKC α をknockdownした状態で、IL-1 β 刺激によるiNOS遺伝子発現およびNF- κ Bの核内移行をそれぞれRT-PCR/Northern blot及びEMSA法を用いて観察した。また、PKC α の存在はWestern blot法を用いて検討した。AS-PKC α によるPKC α のknockdownはIL-1 β によるiNOS遺伝子発現をほぼ50%抑制し、PKC阻害薬であるRo 31-8220を処置した場合は、iNOS遺伝子の発現はほぼ完全に抑制された。これによりiNOS遺伝子発現はPKC依存性であり、PKC α がその活性の約半分を担っていることが示唆された。一方、IL-1 β 刺激によりNF- κ Bは細胞質から核内へ移行することが確認された。RASMにおけるNF- κ Bは、各種抗体を用いたsupershiftの実験により、p65及びp50のヘテロダイマーであることが示された。iNOS遺伝子発現に対する作用とは異なり、IL-1 β によるNF- κ Bの核内移行はAS-PKC α によるPKC α のknockdown、あるいはRo 31-8220処置により何ら影響を受けなかった。従って、NF- κ Bの核内移行はPKC非依存性であることが示唆された。

以上の結果より、RASMにおいては、IL-1 β 刺激によりNF- κ Bの核内移行が観察されたが、この反応はiNOS遺伝子発現とは異なり、PKC α およびそれ以外のPKC isozymesによる調節を受けない、PKC非依存的な経路を介している可能性が示唆された。

39. InsP3 受容体欠損マウス胃平滑筋の性質

名古屋市立大学医学部生理学教室・*東京大学医科学研究所
鈴木光・高野博充・山本喜通・加藤邦夫*・御子柴克彦*

Inositol trisphosphate (InsP3) 1型受容体欠損マウスから摘出した胃平滑筋の性質を細胞内電極を用いて記録した膜電位変化を指標にして調べた。野生型マウス胃体部輪走平滑筋は律動的膜電位変動(緩電位)を発生しており、緩電位上に活動電位の発生もみられた。緩電位は neostigmine により増大し、atropine により抑制されたので、内因性 acetylcholine (ACh) が興奮性に作用していることがわかった。Nifedipine は活動電位を消失させ、緩電位の振幅を減少させたので、これらの電位成分は L 型 Ca チャネルが関与していると思われた。欠損マウス胃平滑筋では緩電位発生は認められず、不規則な活動電位の群発がみられ、これらの電位変化は nifedipine で抑制された。ACh はどちらのマウス胃平滑筋でも膜を脱分極させたが、野生型でより大きく脱分極させた。Noradrenaline は α 受容体を介し膜を過分極させ、その作用は野生型と欠損マウスで同じであった。経壁的に筋間神経を電気刺激すると、両型のマウスにおいて抑制性接合部電位 (i.j.p.) が誘発された。野生型における i.j.p. の振幅は nitroarginine により減少し、neostigmine や apamin により興奮性接合部電位 (e.j.p.) に反転した。E.j.p. は atropine により抑制された。そこで野生型マウス胃平滑筋にはコリン作動性興奮神経と非アドレナリン作動性ならびに NO 作動性抑制神経が分布していることがわかった。欠損マウスにおける i.j.p. は nitroarginine や neostigmine で変化せず、apamin で消失した。以上の結果から、InsP3 受容体欠損マウス胃平滑筋はムスカリン様受容体の機能低下、NO ならびにコリン作動性神経機能の欠損、及び筋原性自発活動の消失、などの変化をきたしていることがわかった。

40. 血管平滑筋におけるトロンボキサラン A₂ 受容体刺激によるホスファチジルコリン水解

東北大学大学院 薬学研究科 分子生物薬学
中畑則道、高野博通、中谷圭吾、大泉康

トロンボキサラン A₂ (TXA₂) は血管平滑筋を強力に収縮させることが知られている。その情報伝達系としては、Gq を介してホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PIP₂) を分解し、Ca²⁺ 動員性のセカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃) とプロテインキナーゼ C を活性化するジアシルグリセロール (DAG) の生成が考えられているが、それ以外の系の存在も示唆されている。一方、以前よりある種の化合物が血管と血小板に存在する TXA₂ 受容体を区別することが報告され、受容体のサブクラスが存在とその情報伝達系が異なることが予想されていた。そこで、本研究では血管平滑筋細胞におけるホスファチジルコリン水解反応について検討を加えた。

TXA₂ 受容体の安定なアゴニストである STA₂ は、ブタ大動脈より得られた初代培養血管平滑筋細胞において DAG の蓄積をもたらした。ホスホリパーゼ D の活性をエタノール存在下のホスファチジルエタノールの蓄積で測定したところ、STA₂ はわずかにその活性を上昇させたが、その作用はホルボールエステルの PDBu やアンギオテンシン II に比較すると極めて弱かった。一方、ホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C の阻害薬である D-609 は STA₂ による DAG 生成を用量依存的に抑制し、その IC₅₀ は約 20 μ M であった。それに反して、PDBu による DAG 生成は D-609 によって部分的にしか抑制を受けず、アンギオテンシン II によるジアシルグリセロールの生成はほとんど D-609 によって影響を受けなかった。また、ウサギ大動脈平滑筋の STA₂ による収縮反応を D-609 は用量依存的に抑制した。以上の結果より、血管平滑筋における TXA₂ 受容体刺激はホスファチジルコリン特異的ホスホリパーゼ C を活性化して DAG を生成し、その DAG によるプロテインキナーゼ C の活性化が、持続性の収縮反応をもたらしているものと思われる。

41. ニワトリ筋胃平滑筋の収縮制御機構における rhoA / ROCK 系の関与

東京大学大学院 農学生命科学研究科 獣医薬理学教室
堀 正敏、尾崎 博、唐木 英明

【目的】ミオシン、ミオシン軽鎖キナーゼおよびミオシンホスファターゼなど、平滑筋の収縮蛋白系の生化学的材料の多くは、ニワトリの筋胃平滑筋より調製されている。近年、哺乳動物の平滑筋の収縮機構に、低分子量GTP結合蛋白質であるrhoAとそれによって制御される(rho-associated coiled-coil forming serine/threonine kinase)ROCKが重要な役割を果たしていることが明らかにされたが、ニワトリ筋胃平滑筋の収縮制御機構へのrhoA/ROCK系の関与の有無に関しては、その構成蛋白質の存在も含めて不明である。そこで本研究ではニワトリ筋胃平滑筋の収縮制御機構におけるrhoA/ROCK系の関与を検討した。【結果】fura-2を負荷したニワトリ筋胃平滑筋標本において、高濃度K⁺(155mM)またはカルバコール(CCh, 10μM)を投与すると、一過性の細胞内Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i)の増加とそれに伴って一過性の収縮が生じた。両者の関係を時間経過を追って比較すると、高濃度K⁺およびCCh刺激時の[Ca²⁺]_iと収縮の軌跡はほぼ一致し、Ca²⁺感受性の変化は見られなかった。α毒素処理スキンドファイバー標本において、CCh(10μM)+GTP(100μM)の前処置はpCa²⁺-収縮関係に全く影響しなかったが、GTPγS(100μM)前処置によりCa²⁺感受性の増加が認められた。ウエスタンブロット解析により、ラット大動脈平滑筋においてはrhoA、ROCK I、ROCK IIのいずれも検出されたのに対して、ニワトリ筋胃平滑筋においてはrhoAとROCK IIは認められたものの、ROCK Iは検出されなかった。

【考察】ニワトリ筋胃平滑筋において、G蛋白質を介するCa²⁺感受性増加機構すなわちrhoA/ROCK II系を介した収縮のCa²⁺感受性増加機構は存在するが、ムスカリン受容体刺激によってはこの系が活性化されない可能性が示唆された。この理由として、1)ニワトリ筋胃平滑筋においては受容体刺激とROCK IIの連関が欠損している可能性と、2)受容体刺激に係わるROCKのサブタイプはROCK Iである可能性が考えられた。

42. 受容体作動性陽イオンチャネルとtrp1関連遺伝子(trp6)の分子的関連

九州大学医学部薬理学教室、*国立岡崎共同研究機構生理研
井上 隆司、*森 泰生、伊東 祐之

【目的】ショウジョウバエの光受容体変異の原因遺伝子trpは細胞内Ca²⁺貯蔵部位の枯渇によって活性化され、Ca²⁺透過性の高い陽イオンチャネルと考えられてきた。しかし近年、trp1関連遺伝子産物の中にはG蛋白質共役型受容体によって活性化される非特異的陽イオンチャネルが存在することが注目されつつある。本研究ではマウスの脳からクローニングされた新しいtrp1遺伝子の一つ、trp6に対応する陽イオンチャネル活性(Trp6)の生物物理的・薬理学的特性を平滑筋のG蛋白質共役型陽イオンチャネルのそれと比較検討し、両者の分子的対応の可能性を検索した。

【方法】trp6をHEK293細胞に強制発現し、ナイスタチン穿孔法による電位固定下に受容体刺激で活性化される電流解析を行った。薬物はY-チューブ法により急速投与した。

【結果】保持電位-50~-60mVでカルバコールあるいはATP(1μM≦)を投与すると著明なノイズ増加を伴う内向き電流が活性化された。準生理学的条件下におけるTrp6電流の電流電圧関係は、外向き整流を示し、平衡電位は0mV付近であった。イオン置換実験の結果、Trp6チャネルはNa⁺、Cs⁺、Ca²⁺、Ba²⁺を透過させる陽イオン選択的なチャネルであることが分かった。同様の電流はジアシルグリセロール誘導体(OAG, 100μM)によっても活性化されたが、サブシガーギン(2μM)は無効であった。細胞外にCa²⁺(10μM≦)を添加するとゆっくりとしたTrp6電流振幅の増強とそれに引き続く抑制が観察された。またこの電流は陽イオンチャネル阻害薬として知られるアミロライド(100μM)、SK&F96365(35μM)、La³⁺(100μM)によって強く抑制され、フルフェナム酸(100μM)によって数倍に増強した。これらの性質はウサギ門脈平滑筋のα₁-アドレナリン受容体作動性陽イオンチャネルに酷似しており、両者には分子的レベルで何らかの関連のあることが強く示唆された。

43. ラット平滑筋における A 型 K^+ チャンネルサブタイプ、Kv4.3 の発現分布と機能解析

名古屋市立大学 薬学部 薬品作用学・薬物治療学*
大矢 進、奥 琢磨*、田中麻美子、渡辺 稔、今泉祐治*

早期不活性化 K^+ 電流 (I_A) は、活動電位の発火タイミングの決定や持続時間の調節に寄与している。また、細胞工学・電気生理学を駆使した研究により、心筋や神経細胞における同様の電流成分 I_{to} 、 I_{sA} は Kv4.2・Kv4.3 から構成されていることが明らかになった。我々は、半定量的 RT-PCR 法により、A 型 K^+ チャンネルサブタイプのうち Kv4.2・Kv4.3 が平滑筋の I_A に寄与し、Kv4.3 については C 末端細胞内領域にフレームシフトを伴わない 19 残基の挿入配列を有する新規スプライスバリエントであることを示唆した。

本研究では、平滑筋の I_A が Kv4 のヘテロテトラマーから構成されるかどうかを検討するために、競合的 PCR 法を用いて各種平滑筋（頸動脈・腸間膜動脈・膀胱・輸精管）における Kv4.2 及び Kv4.3 mRNA 発現量を定量化した。また、Kv4 の電流不活性化機構は、Kv1 において報告されている S6 及び N 末端細胞内ドメインを介した電流不活性化機構（それぞれ C 型、N 型不活性化機構）とは異なることが示唆されている。そこで、Kv4.3 の C 末端細胞内ドメイン deletion mutant (Kv4.3D) を HEK293 細胞に形質導入し、Kv4.3 の電気生理学的特性と比較検討することにより C 末端細胞内ドメインの電流不活性化への寄与を検討した。

競合的 PCR の結果、実験に用いた全ての平滑筋において Kv4.2 と比べて Kv4.3 mRNA がかなり優位に発現しており、平滑筋の I_A は、Kv4.3 のホモテトラマーより構成される可能性が示唆された。また、Kv4.3 mRNA は、膜興奮性の低い血管平滑筋と比べて膜興奮性の高い泌尿器平滑筋において高発現しており、膜興奮性の高い平滑筋細胞において I_A 密度が比較的高いという知見と一致した。さらに、パッチクランプ法を用いて Kv4.3 と Kv4.3D の電気生理学的特性を比較したところ、Kv4.3D において不活性化からの回復速度が有意に遅かった。したがって、平滑筋の I_A の電流不活性化機構に Kv4.3 の C 末端細胞内ドメインが少なくとも一部寄与する可能性が示唆された。

44. モルモット胃輪走筋の自発活動の性質

名古屋市立大学医学部第一生理
福田裕康、鈴木 光

胃平滑筋の自発的膜電位変化 (slow wave) の発生機序には未だ不明瞭な点が多い。自発活動の研究の多くは輪走筋、縦走筋の両方が存在する標本で行われてきたが、今回モルモット胃輪走筋 (1~2 x 0.5mm) のみを含む標本を用い、自発活動の性質を微小電極法による膜電位と蛍光指示薬 (Fura-2) による細胞内 Ca^{2+} の同時測定によって調べた。自発活動の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は膜電位の変化に続いて観察された。Nifedipine ($10^{-6}M$) は電位の自発活動変化にみられる Ca^{2+} スパイク成分のみを消失させ、それに伴う細胞内 Ca^{2+} の増加を半分減少させた。この自発活動は BAPTA-AM ($10^{-5}M$) により細胞内 Ca^{2+} を低下させると消失した。また、 Ca^{2+} -ATPase の阻害薬である CPA ($10^{-5}M$) は一過性に膜の脱分極・自発活動の亢進とそれに伴う細胞内 Ca^{2+} を増加させたが、しだいに減少させついでには自発活動を消失させた。細胞内 Ca^{2+} ストアーからの IP_3 -sensitive Ca^{2+} release を抑制する 2-APB ($3 \times 10^{-5}M$) も自発活動を消失させた。 Ca^{2+} -sensitive Cl channel の阻害薬である DIDS ($5 \times 10^{-5}M$) は持続的な細胞内 Ca^{2+} の増加を伴っていたが、電位の自発活動を消失させた。これらの結果から slow wave による Ca^{2+} の流入は、電位依存性 L 型 Ca^{2+} channel を介する Ca^{2+} 流入と電位に依存はしているものの電位依存性 L 型 Ca^{2+} channel を介さない Ca^{2+} 流入がある事がわかった。しかし、どちらの Ca^{2+} 流入も律動的に変化していたので、胃平滑筋の自動運動に関与していると考えられた。また、胃平滑筋の自発活動にはイノシトールリン酸の代謝による筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離が重要な役割を果たしていると考えられた。

45. マウス小腸平滑筋の性質

名古屋市立大学医学部生理学教室
高野博充・鈴木光

胃を始めとする消化管平滑筋は神経活動を介さないで一定のリズムを持って自発的に運動をしている。このとき、これらの平滑筋細胞は slow wave と呼ばれる周期的な膜電位変化を発生させている。この slow wave が自発運動を誘発させていると考えられている。しかし、slow wave そのものについては、その発生メカニズムやリズムの制御、関与するイオン電流などについては不明な部分が多い。今回我々は、マウス小腸平滑筋において観られる slow wave の性質について、ガラス微小電極による細胞内導出法を用いて検討した。標本は 4 週齢の雄 B-6 マウスの回腸を摘出して、粘膜を除去して輪走筋標本を作成した。平滑筋の膜電位はおよそ -53mV で、slow wave を毎分 24 回ほどの頻度で発生しており、しばしば反復性の活動電位が slow wave 上に発生した。活動電位は nifedipine によって抑制され、slow wave の振幅を減少させたので、これらの電位成分には L type Ca^{2+} チャンネルを介する電流が関与しているものと考えられた。細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位への Ca^{2+} イオンの取り込みを抑制する CPA は slow wave の振幅と活動電位を抑制し、slow wave の頻度を毎分 13 回に減少させた。Inositol trisphosphate (IP_3) 受容体を阻害する 2APB は、膜を 5mV 脱分極させ、slow wave の振幅を大幅に抑制したが、発生頻度はあまり変化させなかった。slow wave の発生に関与する細胞内 Ca^{2+} や IP_3 受容体、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位の働き等について考察した。

46. イヌ脳底動脈における伸展誘発性収縮と伸展速度の関係

静岡県立大学薬学部薬理学教室
小原一男、小出昌代、中山貢一

【目的】血管平滑筋は伸展などの機械的刺激により収縮することが知られているが、そのカルシウム動員機構については不明な点が多い。そこで、イヌ脳底動脈において伸展誘発性収縮と伸展速度の関係について検討した。

【方法】雌雄雑犬（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種々の速度で初期長の 50% の伸展を加え、発生した張力を等尺性に記録した。

【結果】伸展速度 5 mm/sec 以上の機械的刺激により、速度依存性に張力の発生が認められ、伸展速度 30 mm/sec で最大収縮を生じた。この収縮はカルシウムチャンネルブロッカーのニカルジピン (100 nM) や伸展活性化チャネルを抑制する Gd^{3+} (1 mM) で約 70% 抑制され、残りの部分は筋小胞体に作用するタブシガルギン (0.1 mM) により消失した。一方、テトラエチルアンモニウム (TEA, 5 mM) 存在下、伸展速度 0.2 mm/sec 以上の機械的刺激により速度依存性に収縮が惹起され、速度 1 mm/sec で最大収縮を生じた。この収縮はニカルジピンや Gd^{3+} で完全に抑制されたが、タブシガルギンにより影響されなかった。さらに、TEA 存在下でも速度 5 mm/sec 以上の伸展刺激により生ずる収縮はニカルジピンにより約 70% しか抑制されず、残りの部分はタブシガルギンにより消失した。

【考察】以上の結果より、イヌ脳底動脈において機械的刺激受容応答に関わる活性化カルシウム動員機構が伸展速度により一部異なる可能性が示唆された。

47. モルモット腸間膜動脈最終分枝部の高電位活性化型Ca²⁺電流の加齢による変化

九州大学医学部薬理学教室

森田 浩光、井上 隆司、伊東 祐之

モルモット腸間膜動脈最終分枝部には、ニフェジピン非感受性Ca²⁺電流 (NI-I_{Ca}) が高密度に発現している。NI-I_{Ca}は-50mV付近から活性化され、-10mV付近で最大活性化を示す高電位活性化型 (活性化および不活性化のV_{0.5}; -11.0mVおよび-52.3mV) であった。今回我々は、生後2~20週 of モルモット (100-1100g) を用いてこの電流およびニフェジピン感受性電流 (NS-I_{Ca}) の加齢による変化について検討した。140mM CsCl溶液を充填させた4-6MΩのバッチ電極を用いて5mM Ba²⁺溶液灌流下に、conventional whole-cell clamp法によりBa²⁺電流を観察した。生後2~5週 (100-300g) では、腸間膜動脈最終分枝における全Ba²⁺電流に対するNI-I_{Ca}の占める割合は80%以上であった。しかし10~13週 (500-700g) では約60%、16~20週 (900-1100g) では50%以下と加齢によりその割合が有意に減少した。一方、NI-I_{Ca}の電流密度には加齢によって有意な変化は見られなかった。また、同様の傾向が腸間膜動脈の近位分枝部においても観察された。さらにNI-I_{Ca}はCGRP 1μMには感受性を示さなかったが、substance P 1μM投与により約20%の振幅の抑制が観察された。

以上の結果より、末梢血管においては、加齢に伴うニフェジピン非感受性Ca²⁺チャンネルの相対的減少とニフェジピン感受性Ca²⁺チャンネルの増加が、血圧調節において何らかの重要な生理学的意味をもつことが考えられた。

48. スクレオチドに対する脳血管平滑筋細胞における細胞内 Ca²⁺濃度の変化

東邦大学第二脳神経外科, Mississippi 大学脳神経外科*

岩淵 聡, 青木和哉*, 木村 仁, 牛久保行男, 笠井敬一郎, 上田守三, 鮫島寛次, He Zhang*

【目的】くも膜下出血後に発生する脳血管攣縮の発生機序に関しては、くも膜下腔の血腫, hemolysate の存在が大きな要因であることは論を待たない。我々は、in vitroにおいて hemolysate により脳血管平滑筋細胞が収縮し、細胞内 Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が急激に上昇すること、またこれらの反応に protein tyrosine kinesis が関与していることを報告した。一方、近年この hemolysate に含まれる small molecule のひとつである ATP が spasmogen として注目されている。今回単離した脳血管平滑筋細胞における、スクレオチドに対する [Ca²⁺]_i の変化を測定し、tyrosine kinase の役割を検討したので報告する。【材料および方法】rat の脳底動脈より血管平滑筋細胞を単離し、蛍光指示薬 fura-2 を用いて [Ca²⁺]_i を測定した。agonist として freeze & thaw 法にて犬の動脈血から作成した hemolysate, スクレオチドは ATP, UTP を用い、各種濃度別に [Ca²⁺]_i を測定した。次に tyrosine kinase inhibitor で脳血管平滑筋細胞を preincubate し、同様に agonist による [Ca²⁺]_i の変化を測定して統計学的に比較検討した。【結果】単離した脳血管平滑筋細胞に hemolysate および ATP, UTP を添加すると、いずれにおいても一過性の peak とそれに続く plateau の二相性の [Ca²⁺]_i 上昇が認められ、これらの反応は濃度依存性であった。脳血管平滑筋細胞を tyrosine kinase inhibitor で preincubate すると hemolysate, ATP, UTP による [Ca²⁺]_i の上昇が peak 相, plateau 相とも有意に抑制された。【考察】ATP は赤血球, hemolysate にも多く含まれ、くも膜下出血後の脳血管攣縮の原因物質の一つとしても以前より注目されている。今回、ATP 或いは P_{2u} receptor の selective agonist である UTP を脳血管平滑筋細胞に添加すると [Ca²⁺]_i の上昇が認められ、hemolysate のそれに類似するものであった。またこれらの上昇は hemolysate と同様に tyrosine kinase inhibitor により抑制され、hemolysate による [Ca²⁺]_i の上昇のメカニズムとして、ATP による P_{2u} receptor を介した IP₃ による細胞内 Ca²⁺ store からの放出が関与している可能性が示唆された。

49. Calcium homeostasis in rat resistance size arteries determined by simultaneous measurements of calcium transients and membrane currents.
IBLS, West Medical Bldg., University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, Scotland
Kamishima, Tomoko & McCarron, John G,

The largest change in blood pressure occurs in resistance-sized arteries (diameter < 200 μm), and these small arteries are important in blood flow regulation. However, little is known as to how the intracellular Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is controlled in resistance arteries. We investigated Ca^{2+} homeostasis in smooth muscle cells dissociated from rat cerebral superior arteries (diameter $\sim 160 \mu\text{m}$). Single cells were voltage-clamped using the conventional whole-cell clamp configuration, and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured using Fura-2. A depolarizing pulse from a holding potential of -70 mV to 0 mV evoked Ca^{2+} current (I_{Ca}) and raised $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Upon repolarization, increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ returned to the resting level. The I_{Ca} was time-integrated and by estimating the cell volume of 0.7 pL , converted to an expected total $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase. The total $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was divided by the actually measured increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the difference between resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the actually measured $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The ratio, or Ca^{2+} buffering power, was about $80 \sim 180$, indicating about 99 % of Ca^{2+} entering the cell is buffered. The buffering power increased to $170 \sim 280$ when cells were treated with $30 \mu\text{M}$ ryanodine, an inhibitor of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. Thus, a significant amount of Ca^{2+} was released from sarcoplasmic reticulum (SR) by Ca^{2+} influx. The efficacy of Ca^{2+} induced Ca^{2+} release was higher when the depolarization was smaller, and we attribute this to larger driving force on Ca^{2+} at less positive potentials. Next, the Ca^{2+} clearance mechanisms were examined. Ca^{2+} removal rate was calculated as the negative derivative of polynomial fit to the declining phase of Ca^{2+} transient. Ca^{2+} removal rate was determined in the control cells and cells treated with ryanodine or thapsigargin both of which will disable Ca^{2+} uptake by SR. Over $[\text{Ca}^{2+}]_i$ range of $150 \sim 275 \text{ nM}$, the rate of Ca^{2+} removal in store-disrupted cells were significantly slower than that of the control cells. On the other hand, the replacement of extracellular Na^+ with choline⁺ did not affect Ca^{2+} removal. Thus, SR Ca^{2+} uptake, but not Na^+ - Ca^{2+} exchange, is important in Ca^{2+} clearance in this preparation. We conclude that SR plays significant roles in Ca^{2+} homeostasis in small cerebral arterial smooth muscle cells. *Supported by the Wellcome Trust.*

ポスター展示

P-1. 食道アカラシアの術前術後評価における飲水負荷試験の有用性についての検討

日本大学第3外科

田中和彦、佐藤博信、山形基夫、村山 公、宋 圭男、大塚善久、深瀬知之、小林秀昭、
畠中康晴、小坂和子、田中 隆、岩井重富

当教室では、食道アカラシア等の術前術後評価法としてX線型による評価、食道内圧測定等を行いその改良を行ってきた。食道内圧測定による術前術後評価の問題点として患者の愁訴と必ずしも一致しないこと、また内圧測定用カテーテルは検査の特性上柔軟性を持たせてあるため、通過障害が著しい症例ではカテーテルの噴門通過が困難でLESPの測定に際し、経内視鏡的なカテーテルの誘導が必要である等の問題点があり、また、従来の食道内圧検査では嚥下時の動態についての評価は困難であった。そこで我々は嚥下時の動態を評価する目的で飲水負荷試験を行い、その有用性を検討した。

対象と方法：正常成人5例および内視鏡下に手術を施行した食道アカラシア10例に対し術後評価をおこなった。測定機器はゲールテック社製カテーテルチップ形3chセンサーを使用した。

方法は、カテーテルを門歯より30cmで固定し、臥位のまま水道水50mlを飲用、その後の静止圧上昇、飲用前の静止圧までの回復時間を測定した。

結果：正常成人では飲水後、静止圧の上昇を認め、その後速やかに飲水前の静止圧に回復した。食道アカラシア術後では愁訴の改善した7例で飲水負荷後速やかな静止圧の回復を見たが、2例で回復時間の延長、1例で静止圧回復時間の延長と負荷前の静止圧の上昇が認められ、X線型の変化や愁訴の強さと一致していた。本法は簡便で患者への負担も小さく、嚥下時の食道内圧の動態を客観的に評価できることから、食道アカラシアの術後評価においてよい指標になるものと考えられた。

P-2. 培養モルモット気管支平滑筋細胞増殖に対する endothelin-1 (ET-1)の作用

日本大学薬学部機能形態学研究室

木澤 靖夫、大内 希、齋藤 清茂、草間 貞、村上 元

ET-1 は、強力な血管及び気管支平滑筋収縮物質である。一方、ET-1 は細胞増殖促進作用を有しており、ヒトの気管支平滑筋細胞における epidermal growth factor (EGF)による細胞増殖促進作用を ET-1 が増強することが報告されている。このことから ET-1 は、炎症性呼吸器疾患に見られる気道壁リモデリングに何らかの関与をしているものと考えられる。そこで本研究では、モルモットの初代培養気管支平滑筋細胞を用いて ET-1 の細胞増殖に対する効果を検討したので報告する。

実験方法： Hartley 系雄性モルモット (3~4 週齢) より気管支を摘出し、平滑筋層を分離して 0.2% collagenase により平滑筋細胞を単離した。平滑筋細胞は、10% FBS を含む Ham's F12 medium を用いて 10 日間培養し、その後 FBS 濃度を 0.5% として薬物を含む培養液にて 5 日間培養し、細胞増殖測定キットを用いて細胞増殖能を測定した。

実験結果・考察： ET-1 は濃度依存的にモルモット気管支平滑筋細胞の増殖を促進し、EGF による細胞増殖促進作用を有意に増強した。この ET-1 による細胞増殖促進作用は、BQ-123 により有意に抑制されたが、BQ-788 によっては影響を受けなかった。これらの結果は、ET-1 が単独でも気管支平滑筋細胞の増殖を促進し、EGF による細胞増殖促進に対しても増強作用を有することを示している。また、ET-1 による細胞増殖促進作用は、主に ET_A 受容体を介して生じることが示唆された。本研究により、気管支喘息における気道過敏性に密接に関わっていると考えられる気道壁リモデリングに、ET-1 が促進的に関与している可能性が示された。

P-3. 抗ムスカリン薬の血管平滑筋細胞 α -アドレナリン受容体に対する拮抗作用について

東邦大学 医学部 薬理学教室¹, 国立小児病院 研究センター 小児薬理研究部²
 水流 弘通¹, 篠浦 ひとみ², 辻本 豪三², 内山 利満¹

【目的】われわれは先にウサギおよびイヌの門脈には血管収縮性コリン作動性神経が存在することを明らかにした。また α -アドレナリン受容体アゴニスト (norepinephrine あるいは methoxamine) であらかじめ収縮させた門脈は、内皮の有無にかかわらず acetylcholine によって収縮したが、atropine sulfate に対しては弛緩反応を示すことを報告した。本研究では数種抗ムスカリン薬の血管平滑筋 α -アドレナリン受容体に対する拮抗作用について検討した。【実験方法】雄性日本白色ウサギを pentobarbital sodium で麻酔し、放血致死後、門脈を速やかに摘出、氷冷 Krebs' bicarbonate 液に浸した。門脈切片から縦条片標本を作成し、20 ml Krebs' bicarbonate 液を含み、混合ガスを通気、37°C に保ったガラス組織浴槽中に懸垂した。等尺性張力変化をインク書きオシログラフに記録した。

【結果】1) Norepinephrine あるいは methoxamine であらかじめ収縮させた門脈標本は、atropine に対して弛緩反応を示したが、2) atropine は KCl や histamine あるいは 5-hydroxytryptamine (serotonin) などによる収縮には無効であった。3) 選択的 M_3 受容体拮抗薬 *p*-fluorohexa-hydro-sila-difenidol (*p*-F-HHSiD) も atropine と同程度の弛緩作用を示したが、scopolamine と選択的 M_1 受容体拮抗薬 pirenzepine の作用はごく弱かった。4) Atropine は濃度依存性に norepinephrine の濃度-収縮反応曲線を右方に平行移動させた。【考察・結論】以上の結果から、atropine は血管平滑筋の α -アドレナリン受容体に対して競合的に拮抗することが示唆された。さらに、 α_{1A} , α_{1B} および α_{1D} 受容体を安定発現させた Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて [¹²⁵I] HEAT の受容体結合実験をおこない、atropine の α -受容体サブタイプに対する結合親和性を検討する予定である。

P-4. 胃管形成術後の胃内圧測定

新潟大学医学部、生理学第二教室*、外科学第一教室

寺島哲郎、渡辺直純、丸田智章、長谷川潤、西巻正、鈴木力、畠山勝義、本間信治*

序：我々は、食道癌で食道、胃切除、大腸置換術後の大腸の運動を分析、報告した (J. Smooth Muscle Res., 1(2), J83 1997)。今回は胃管による再建術後の再建胃管胃の運動を測定分析した。方法：圧センサーカテーテル (5チャンネル) (ユーロテック社製) を透視下で、被検者 (n=6) の鼻腔を介し胃管に挿入、第一センサーが肩甲骨下近くに、くるようにし、Digitrapper に接続して内圧を連続記録した。センサー間距離は 1-2 が 3 cm, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6 は 5 cm であった。カロリーメート 2 本 (100 kcal/本) 摂食前後の内圧の平均値、平均持続時間、FFT による周波数分析等をおこなった。内圧周波数は、胃電図にならぬ、bradygastria (0-2.4 cpm), 3cpm (2.4-3.7), tachygastria (3.7-10.0), duodeno-respiratory (10.0-15.0) と分類した。

結果：食後、1、2チャンネルでは、3 cpm の成分は増加 (平均 17%)、bradygastria 成分は減少 (平均 15%) する傾向にあった ($p < 0.05$)。チャンネル 1 の Dominant power frequency (DPF) は平均 2.07 cpm で、Dominant frequency instability coefficient (DFIC) は食後減少傾向にあった。PDF が食前後とも bradygastria の場合は、食前後の power ratio は減少傾向にあり、PDF が bradygastria から 3 cpm に変化する場合は power ratio が増加傾向にあり、PDF が食前後とも 3 cpm の場合も power ratio が増加傾向にあった。

結語：以上の結果は、胃管が本来の胃の運動能を保持していることを示すと想像した。

P-5. モルモット回腸縦走筋の内在性ヒスタミンについて

昭和大学薬学部薬理学教室

黄 洋一、入江香織、百瀬和亨

【目的】モルモット回腸縦走筋には比較的多量の内在性ヒスタミンが存在しており、ヒスタミン受容体を介する縦走筋の反応に生理的な役割を果たすことが示唆される。一般に、組織中のヒスタミン含有細胞として、神経細胞や肥満細胞の存在が知られている。しかし、縦走筋層におけるヒスタミン作動性神経の存在は明らかでない。また、モルモット回腸の肥満細胞は、ほとんどが粘膜層に分布している。従って、縦走筋の内在性ヒスタミンが、どのような細胞に由来するかについては不明な点が多い。本研究では、この内在性ヒスタミンの由来と性質について検討した。【方法】縦走筋の収縮反応はオルガニバス中で、等尺的に測定記録した。ヒスタミンの定量は、イオン交換 HPLC-ポストカラム OPA 誘導体化法により行った。ヒスタミンの分布は、抗ヒスタミン抗体により免疫組織化学的に検討した。【結果・考察】オルガニバス中に懸垂した縦走筋標本にジギトニンを添加し、表面を透過性処理すると持続的な収縮反応が引き起こされた。この収縮反応は、H1 受容体アンタゴニストであるピリラミンにより大部分が抑制された。また、この処理によりオルガニバス中にヒスタミンの遊離が認められた。一方、ニコチン受容体アゴニストであるエピバチジンにより神経を刺激した際の収縮反応は、ピリラミンにより抑制されず、ヒスタミンの遊離も認められなかった。また、肥満細胞からヒスタミンを遊離するコンパウンド 48/80 による縦走筋標本の収縮反応およびヒスタミン遊離は認められなかった。以上の結果から、縦走筋の内在性ヒスタミンは、神経細胞および肥満細胞に由来するものでないことが示唆された。そこで、縦走筋から単離細胞を調製し、その塗抹標本を抗ヒスタミン抗体により免疫染色した。その結果、平滑筋細胞に、ラット腹水由来の肥満細胞に匹敵する強い陽性反応が認められた。以上の結果から、モルモット回腸縦走筋の主要なヒスタミン貯蔵細胞は、平滑筋細胞であると結論した。

P-6. モルモット回腸縦走筋の収縮反応に対する局所麻酔薬の抑制作用

日本大学松戸歯学部薬理

久保山 昇、藤井 彰

【目的】局所麻酔薬(LA)は、構造的あるいは機能的に類似性を有するNa⁺およびCa²⁺チャネルの両方に抑制的に作用することを神経細胞を用いてPatch clamp法により明らかにした。本研究では、モルモット回腸縦走筋を用いて、刺激薬の収縮反応に対するLAの抑制機序を検討した。【実験方法】モルモット回腸を摘出し、縦走筋のみを剥離して収縮反応を等張性に記録した。fura-2負荷回腸縦走筋条片を用いて細胞内遊離Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)と収縮の同時測定を行った。共焦点レーザー顕微鏡では、単一回腸縦走筋細胞の[Ca²⁺]_iの分布と経時的变化を画像化した。刺激薬は高K⁺、Bay K8644、ACh、HistamineおよびBK、LA (10⁻⁶-10⁻³M)はLidocaine(Lid)、Bupivacaine(Bup)、Mepivacaine(Mep)、Prilocaine(Pril)、Dibucaine(Dib)、Benzocaine(Benz)、Procaine(Proc)、Tetracaine(Tet)を用いた。【結果】高K⁺(50 mM)、受容体刺激(10⁻⁸-10⁻⁵M)は、腸管平滑筋を濃度依存的に収縮した。この収縮反応は、細胞外液Ca²⁺濃度に依存し、Ca²⁺を除去すると消失した。また、各種刺激薬による収縮反応は、L型Ca²⁺チャネル拮抗薬(10⁻⁸M)で強く抑制された。LAは、高K⁺および受容体刺激による収縮反応を濃度依存的に抑制し、濃度反応曲線を右下方に移動させ非競合的拮抗反応を示した。刺激薬の収縮反応を抑制する強さは、Dib ≧ Bup ≧ Tet ≧ Mep ≧ Pril ≧ Lid > Benz > Procの順であった。高K⁺収縮に対するLidの抑制効力を1とすると、Dib(16.0) > Bup(13.2) > Mep(7.3) > Tet(6.3) > Pril(2.7) > Lid(1.0) > Benz(0.6) > Proc(0.1)の順であった。LAは刺激薬によるMn²⁺流入を抑制することから、非特異的カチオンチャネルを遮断した。LAのNa⁺チャネル遮断効力(末梢神経)と腸管平滑筋収縮の抑制効力の間に正の相関関係を示した。刺激薬によりfura-2負荷条片は、[Ca²⁺]_iの増加に続いて収縮反応を発生した。また、刺激薬により[Ca²⁺]_iの分布の相違が認められた。以上の結果より、LAは、細胞膜に存在するL型Ca²⁺チャネルおよび受容体作動性Ca²⁺チャネルを介したCa²⁺流入を阻害し、刺激薬による収縮反応を抑制した。

P-7. エストロゲン及びプロゲステロンによるモルモット結腸紐弛緩反応の相違

九州大学医学部 心臓血管研究施設 分子細胞情報学部門¹⁾、同 小児外科²⁾
 家入里志¹⁾²⁾、平野勝也¹⁾、西村淳二¹⁾、金出英夫¹⁾、水田祥代²⁾

【目的】 エストロゲンが血管平滑筋を弛緩させることは報告されているが、消化管運動に対する性ホルモンの作用は明らかではない。本研究ではモルモット結腸紐を用いてエストロゲン及びプロゲステロンの腸管運動に対する作用を比較検討した。

【方法】 Fura-PE3表面蛍光測光法を用いてモルモット結腸紐平滑筋条片の細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変化と発生張力を同時測定した。いずれも非刺激時(5.9mMK⁺)を0%、60mMK⁺脱分極刺激時を100%として相対的に表した。実験はテトロドトキシン(1μM)存在下で行った。【結果】 1)エストロゲン、プロゲステロンは静止時の[Ca²⁺]_iと張力に影響しなかった。2)細胞外Ca²⁺(2.5mM)存在下に、60mMK⁺脱分極刺激が引き起こす持続的[Ca²⁺]_i上昇及び発生張力をエストロゲン、プロゲステロンはいずれも濃度依存性(100nM-100μM)に抑制した。IC50は13.5μM(エストロゲン)、32.7μM(プロゲステロン)であった。3)エストロゲン、プロゲステロン(10μM)投与30分後の[Ca²⁺]_iと発生張力は、61.4%、51.8%(エストロゲン)、及び82.3%、66.4%(プロゲステロン)であった。すなわち同程度の弛緩を引き起こしたにもかかわらず、プロゲステロンによる[Ca²⁺]_i低下はエストロゲンの場合と比べて小さかった。

【総括】 エストロゲン、プロゲステロンは共に脱分極刺激が引き起こす[Ca²⁺]_i上昇を低下させ、モルモット結腸紐平滑筋を弛緩させた。しかし両者の作用には相違が認められた。エストロゲンによる弛緩反応は[Ca²⁺]_i低下に依存したが、プロゲステロンによる弛緩反応は[Ca²⁺]_i低下に加えて平滑筋収縮装置のCa²⁺感受性低下も関与する可能性が示唆された。

P-8. ウサギ消化管平滑筋細胞における細胞内カルシウム取り込みに対するチロシンキナーゼの関与

富山医科薬科大学医学部麻酔科学教室¹⁾、東邦大学薬学部疾病薬学教室²⁾
 畠山 登¹⁾、澁谷伸子¹⁾、増田 明¹⁾、山崎光章¹⁾、伊藤祐輔¹⁾、百瀬弥寿徳²⁾

チロシンキナーゼは細胞内情報伝達経路に対して大きな役割を果たしていると認識されている。最近では平滑筋の収縮反応におけるチロシンキナーゼの関与についても報告が見られ、その細胞内カルシウム動態に及ぼす作用についての解明が期待される。今回、我々はウサギ大腸粘膜下に存在する muscularis mucosae を用い、whole-cell voltage clamp 法によりカルシウム依存性カリウム電流である spontaneous transient outward current (STOC)を観察することにより細胞内カルシウム動態と細胞内へのカルシウム取り込みに対するチロシンキナーゼの関与について検討した。その結果、チロシンキナーゼ阻害作用を持つ genistein (0.1 mM)は STOC を遮断した。また一方では Na₃VO₄の適用下(0.2~0.6 mM)では STOC は濃度依存性に増大した。さらに genistein (0.1 mM)は細胞内へのカルシウムの取り込みを抑制した。さらに、epidermal growth factor (200 ng/ml)の適用下にて STOC は増大した。以上の結果より、細胞内に貯蔵されているカルシウムの放出、ならびに細胞内へのカルシウムの取り込みに対するチロシンキナーゼの関与が明らかとなった。さらに、消化管の炎症性疾患においてサイトカインなどの放出による消化管の運動異常において、この経路の関与が示唆された。

P-9. ラット抵抗血管の Ach-induced hyperpolarization に及ぼすプロポフォールの効果

富山医科薬科大学集中治療部、麻酔科学教室*、東邦大学薬学部疾病薬学**
山崎光章、永川 保*、渋谷伸子*、畠山登*、伊藤祐輔*、百瀬弥寿徳**

抵抗血管において、EDHF (endothelium hyperpolarizing factor) は内皮依存性の血管拡張に関与している。また、*in situ* においては、血管平滑筋の血管壁張力は膜電位と比例関係にある。本研究では、まずプロポフォールの抵抗血管(*in situ*)の膜電位に対する作用を検討した。次に、プロポフォールの Ach-induced hyperpolarization (EDHF が関与していると考えられる) に対する作用について検討した。

雄 SD ラットに麻酔後、実体顕微鏡のチャンパー (37°C) 上で腸間膜動脈を剥離した。剥離後、physiological salt solution (PSS) を血管外から灌流し 6 hydroxydopamine を適用した。[実験1, n=6] ガラス管微小電極を動脈壁へ 5 秒間以上 5 回刺入し血管平滑筋の膜電位を測定した (対照値)。その後 30mg/kg/h のスピードでプロポフォールを大腿静脈内へ持続投与し、同様に膜電位を測定した。[実験2, n=10] プロポフォールを持続投与した群と投与しなかった群に Ach (3×10^{-6} M)、L-NAME、インドメタシンを含んだ PSS を灌流し、膜電位を測定した。

1) 膜電位は -41.6 ± 1.4 mV (対照値) から -44.0 ± 1.7 mV へ有意に過分極した。2) プロポフォールを持続投与しなかった群では、Ach 投与により -38.8 ± 2.2 mV から -45.7 ± 4.6 mV へ過分極した。一方、プロポフォール持続投与群 (-43.5 ± 1.3 mV) では、Ach 投与により -45.0 ± 1.6 mV と膜電位はほぼ変化しなかった。

In situ 抵抗血管平滑筋においてプロポフォールによる弛緩作用が示唆された。この血管において Ach-induced hyperpolarization が観察されたが、プロポフォールの持続投与によりその膜電位以上の Ach-induced hyperpolarization は観察されなかった。

P-10. 平滑筋細胞におけるペプチド誘発 ATP 放出の細胞内シグナリング

福岡大学 医学部 薬理、*機能研、**構造研、***同 薬学部薬理
桂木猛、為末敏、佐藤千江美*、薄根貞治*、瀬川勝**、本多健治***

当研究室では消化管を中心とした平滑筋細胞において、ムスカリン性およびプリン性受容体刺激により非神経性に引起される ATP 放出について一連の報告を行ってきた。本研究ではモルモット結腸紐の組織および初代培養平滑筋細胞を用い angiotensin II (AT-II) や substance K (SK) などのペプチドによる ATP 放出がどのような細胞内シグナリングを経て起こされるかについて検討を行なった。[実験方法] ATP は luciferase 法により、また Ins(1,4,5)P₃ (IP₃) は radioreceptor assay 法によりそれぞれ測定された。[結果および考察] 組織切片において AT-II は basal release の約 3 倍の ATP 放出を示し、これは neomycin および thapsigargin によって拮抗された。さらに、この反応は、ミトコンドリア阻害薬の rotenone、oligomycin、CCCP によってほぼ完全に拮抗された。SK にも同程度の ATP 放出作用が認められた。しかし、neuropeptide Y (NPY) と somatostatin (ST) にはこの放出作用は見られなかった。培養細胞において、AT-II は投与後直ちに最大となる IP₃ の accumulation を示し、これは AT1-受容体 antagonist の SC-52458 によって拮抗された。SK もやや弱い IP₃ accumulation を示したが NPY と ST にはこの作用は認められなかった。同細胞の灌流実験において、AT-II は AT1-antagonist によって拮抗される ATP 放出促進作用を示した。Fura II を用いた実験から AT-II は SC-52458 で拮抗される [Ca²⁺]_i の上昇を示した。培養細胞の電顕像では小胞体 (ER) はミトコンドリアに対して極めて近接して存在していた。以上の結果、AT-II は AT1-受容体を刺激し IP₃ 生成促進、ER からの Ca²⁺遊離、さらにこの Ca²⁺シグナルのミトコンドリアへの伝播を経て、何らかの機序により ATP が細胞外へ放出されることが明らかとなった。

P-11. ラット腸間膜動脈平滑筋における内皮依存性弛緩因子, 収縮因子, 過分極因子を介した反応の経時的变化 — 正常血圧ラットと高血圧ラットの比較

¹近畿大学薬学部, ²近畿大学高血圧研究所

関口富美子¹, 中平智広¹, 島村佳一², 砂野 哲¹

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) と Wistar Kyoto ラット (WKY) の腸間膜動脈を用いて高濃度 (10^{-5} M) acetylcholine (ACh) による内皮依存性反応の経時的变化を観察し, 内皮由来弛緩因子 (EDRF, nitric oxide (NO)), 収縮因子 (EDCF), 過分極因子 (EDHF) の関与を比較, 検討した. Noradrenaline (NA) で前収縮させた WKY 標本は ACh によって弛緩反応のみを示したが, SHRSP 標本は一過性の弛緩, 収縮, 持続性弛緩の三相性の反応を示した. SHRSP 標本でみられた一過性収縮は indomethacin (Indo) 存在下で消失した. N^G -nitro-L-arginine (L-NNA) 存在下では WKY 標本においても ACh によって三相性の反応がみられるようになったが, この条件下でみられた収縮反応も Indo 存在下で消失した. Indo と L-NNA 両存在下において WKY 標本はほぼ 100 % の持続性弛緩を示したが, SHRSP 標本は ACh を加えて約 5 分で NA 前収縮レベルにもどる一過性の弛緩反応 (約 75 %) を示した. Apamin と charybdotoxine (ChTX) の両存在下では WKY, SHRSP 両標本ともに ACh によって持続的な収縮反応を示したが, さらに Indo を前処理することで持続的な弛緩反応を示すようになった. Apamin, ChTX, Indo 存在下における弛緩反応には WKY, SHRSP 標本間で差はみられなかった. L-NNA, Indo, apamin, ChTX 存在下では WKY, SHRSP 両標本ともに ACh によって持続性収縮を示した. WKY 標本におけるこの収縮反応は ET_A receptor の阻害薬である BQ-123 処理によって消失したが, SHRSP 標本の収縮反応は影響を受けなかった. 以上, WKY, SHRSP どちらの腸間膜動脈も 10^{-5} M ACh により EDRF (NO), EDHF, EDCF を遊離すること, NO による弛緩には WKY, SHRSP 間で差はないが, EDHF による弛緩は SHRSP 標本で減弱していることが示された. また WKY 標本では ACh により ednotheline-1 も遊離されることが示された.

P-12. 交感神経刺激により誘発される腸間膜動脈収縮への non-N-type Ca^{2+} チャネルの関与の可能性

東邦大学薬学部薬物学教室

望月 佑美, 田中 芳夫, 田中 光, 重信 弘毅

交感神経終末からのノルアドレナリン (NA) の遊離は, 神経終末の電位活性化 Ca^{2+} チャネルを介する細胞外 Ca^{2+} 流入に依存する. NA 遊離過程で中心的役割を果たしている電位活性化 Ca^{2+} チャネルは, N-type チャネルであると考えられている. また, 最近では, non-N-type Ca^{2+} チャネルの関与を示唆する報告もなされている. しかしながら, 血管組織においては non-N-type Ca^{2+} チャネルが関与するか否かについては明らかではない. そこで, 本研究では, 摘出ラット腸間膜動脈標本への交感神経 (電気) 刺激により誘発される収縮反応における non-N-type Ca^{2+} チャネルの関与の可能性について検討した. 【方法】 雄性ラットから腸間膜動脈を摘出し, 内皮を剥離した幅 1 mm のリング標本を作製した. 電気刺激の条件は, 刺激頻度 2-32 Hz, 刺激幅 0.2 msec, 超極大電圧, 刺激時間 30 sec, 5 分間隔とした. 【結果】 ① 腸間膜動脈標本への電気刺激により頻度依存性の収縮反応が惹起された. この収縮は, テトロドトキシン, グアネチジン, プラゾシンで消失したことから, 交感神経終末から遊離される NA によることが示された. ② N-type チャネルを抑制する ω -コノトキシン GVIA は, 低頻度刺激 (2-8 Hz) による収縮をほぼ完全に抑制したが, 高頻度刺激 (12-32 Hz) による収縮は完全には抑制しなかった. ③ 32 Hz 刺激では, ω -コノトキシン GVIA 非感受性の収縮成分は, P-type チャネルを抑制する ω -アガトキシン IVA でさらに抑制され, ω -アガトキシン IVA と ω -コノトキシン MVIIC (N-, P-, Q-type チャネルの非選択的ブロッカー) でほとんど消失した. ④ これらの ω -トキシン処置は, NA の濃度-収縮反応関係に対して顕著な影響を示さなかった. 【考察】 本実験結果から, non-N-type Ca^{2+} チャネル (P-, Q-type チャネル) が腸間膜動脈を支配する交感神経終末にも存在し, 神経終末からの NA 遊離と本血管の緊張性制御にも寄与する可能性が示唆された.

P-13. 腸間膜動脈と大動脈の NO ドナーおよび ANP による弛緩反応におけるマキシ K_{Ca} チャネル活性化の寄与の比較
東邦大学薬学部薬物学教室
相田 美和子、田中 芳夫、田中 光、重信 弘毅

電位活性化、 Ca^{2+} 感受性 K^+ チャネル (マキシ K_{Ca} チャネル) は、血管平滑筋細胞に高密度に存在する。マキシ K_{Ca} チャネルの活性化は、膜電位や細胞内 Ca^{2+} 濃度変動の他に血管作動性物質の刺激によっても修飾される。とりわけ、細胞内 cGMP を上昇させる刺激 (NO 関連物質、心房性ナトリウム利尿ペプチド: ANP) による血管弛緩においては、マキシ K_{Ca} チャネル活性化がその機能発現に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、摘出ラット腸間膜動脈と大動脈標本での NO ドナー (ニトログリセリン、NOR3) および ANP による弛緩におけるマキシ K_{Ca} チャネル活性化の寄与を薬理的に比較検討した。【方法】雄性ラットから腸間膜動脈と胸部大動脈を摘出後、内皮を剥離したリング標本を作製し張力変化を等尺性に記録した。【結果】① いずれの動脈標本でも、ニトログリセリンと NOR3 の濃度依存性弛緩反応はメチレンブルーで著明に抑制されたが、ANP の弛緩は影響されなかった。② マキシ K_{Ca} チャネルの選択的ブロッカーであるイベリオトキシンは、NO ドナーおよび ANP の弛緩反応を腸間膜動脈でのみ有意に抑制し、大動脈標本の弛緩には全く影響しなかった。③ クロマカリムの血管弛緩を著明に減弱させるグリベンクラミドは、NO ドナーおよび ANP の弛緩反応をいずれの動脈でも抑制しなかった。④ ニトログリセリンによる腸間膜動脈の弛緩は、高カリウム液中ではイベリオトキシンによる抑制と同程度にまで減弱した。【考察】NO ドナーおよび ANP による弛緩に対するマキシ K_{Ca} チャネル活性化の寄与は、抵抗性血管においてのみ有意であることが示された。また、NO ドナーによるラット腸間膜動脈の弛緩に関与するマキシ K_{Ca} チャネルの活性化は、主として細胞内 cGMP の上昇を介しているものと推察された。

P-14. ラット大動脈における一酸化窒素 (NO) による弛緩反応 : dopamine, norepinephrine および phenylephrine 存在下での比較
三菱化学生命科学研究所¹、昭和大学薬学部薬理学教室²
石田行知¹、長田直子^{1,2}、百瀬和享²

NO による血管弛緩作用の効力は、高濃度カリウムによる脱分極刺激では小さく、受容体刺激では大きいことが知られている。今回、私達は、NO 遊離薬である NOC 5 の弛緩反応の大きさが、dopamine, norepinephrine および phenylephrine の存在下で異なることを見出したので、その機序を検討した。Dopamine, norepinephrine および phenylephrine (1 μ M) を投与すると大動脈は収縮反応を引き起こした。これらの収縮反応は 0.1 μ M prazosin により消失したことから、 α 1-受容体を介していることが示された。NOC 5 (10 nM-1 μ M) は用量依存性に弛緩反応を引き起こしたが、弛緩反応の大きさは dopamine 存在下の方が norepinephrine や phenylephrine 存在下のときより大きかった。これらの弛緩反応は propranolol (1 μ M, β -拮抗薬) や R(+)-SCH-23390 (1 μ M, D1 拮抗薬) により抑制されなかった。一方、選択的な guanylate cyclase 阻害薬である 1-H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one (3 μ M) は norepinephrine および phenylephrine 存在下の NOC 5 による弛緩反応を抑制したが、dopamine 存在下の弛緩反応は抑制しなかった。高速液体クロマトグラフィー電気化学的検出法により、NOC 5 存在下では dopamine 量が減少することが示された。これらの結果から、NOC 5 から遊離した NO は dopamine と容易に反応し、 α 1-受容体を刺激する dopamine 有効量を減少させ、dopamine による収縮反応が減弱し、dopamine 存在下では見かけ上 NO による弛緩反応が大きく観察されることが示唆される。

P-15. 骨盤神経刺激によって発現する c-fos 蛋白陽性アウエルバッハ神経細胞の分布

神奈川歯科大学 口腔生理学 湯山徳行、水野潤造、田村謙二
同 口腔組織学 都築英子、高橋理

仙部副交感神経の下部消化管に対する神経支配様式を明らかにする目的で、骨盤神経刺激によってアウエルバッハ神経叢内に発現する c-fos 蛋白陽性の神経細胞の分布を検討した。

実験にはモルモット（雄、体重 250-300g）を用い、in vivo と in vitro の 2 種類の実験を行った。In vitro の実験ではケタール（50mg/kg/hr）による麻酔下に、右後腹膜腔内で骨盤神経を露出し、神経束周囲に約 5 μ l のマスタードオイルを注入した。約 3 時間後、頭部への殴打と総頸動脈からの脱血によりモルモットを屠殺し、肛門縁より 0.5cm から 18cm の下行結腸から直腸へかけての腸管を摘出した。In vitro の実験系では、in vivo と同様の方法を用いてモルモットより両側骨盤神経を付着させた下部結腸を摘出し、これを 37 $^{\circ}$ C に加温したクレブス液を灌流させたチャンバー内に固定した。自発性の蠕動運動の開始を確認した後、骨盤神経の末梢端にマスタードオイルを与え、その後約 3 時間チャンバー内に放置した。実験終了後、結腸を 4% のパラフォルムアルデヒドで固定し (overnight) 後、c-fos に対する 1 次抗体 (1:200) を反応させ、最終的にはジアミノベンチジンで発色で c-fos の発現を確認した。

c-fos 蛋白陽性のアウエルバッハ神経細胞は、すべての標本 (in vivo, n=10; in vitro, n=3) で観察された。その分布は個体差が大きかったが、多くの場合肛門縁より 1.5-2.5cm の部分でもっとも多く観察され、口側と肛門側の両方向に向かって次第に減少した。また、同時に行った仙部脊髄の染色では、刺激側の後角神経細胞と、中間外側核に存在する副交感神経節前神経細胞の核内に c-fos 蛋白の発現が観察され、マスタードオイルを用いた骨盤神経刺激が有効であったことが確認された。これらの事実から、モルモットの骨盤神経の下部消化管壁内における神経終末は、骨盤神経が消化管壁に進入すると考えられる部位でもっとも多く、口側と肛門側に向かうに従い減少すると推察された。

P-16. 消化管筋層に分布する組織常在型マクロファージの形態と機能

名古屋大学医学部解剖学第一講座、*東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学薬理学教室
鳥橋茂子、*堀 正敏、*尾崎 博

ヒトを含む哺乳動物の消化管筋層には多数の組織常在型マクロファージがほぼ均一に分布している。これらは通常強い呑食能を示さないが FITC-dextran を静注すると取り込んで標識される。消化管が細菌感染等により刺激されるとこれらマクロファージが様々な生理活性物質を放出して筋層の収縮能に何らかの影響をあたえることを想定し、Lipopolysaccharide(LPS)で刺激した消化管筋層の収縮能とマクロファージの動態について検討した。

材料と方法: ウイスター系ラット回腸を 2-3cm の長さに切りだし、LPS100 μ g/ml を含む栄養液 (37 $^{\circ}$ C) で 4 時間または 8 時間組織培養したのち、粘膜を除去して筋層の一部から RT-PCR 法により iNOS の mRNA を測定した。また残りの組織は平滑筋の収縮能を測定した後固定し、抗 iNOS 抗体、OX6、ED2 抗体による免疫染色を行った。コントロールとして摘出直後の回腸と LPS を含まない正常栄養液で培養した組織を用いた。

結果: 灌流 4 時間で iNOS の mRNA はコントロールに比べて有意に上昇し、iNOS の免疫活性を示すマクロファージの数は経時的に増加した。この時平滑筋の carbachol による収縮は抑制され、この抑制は L-NMMA で解除された。さらに MHCclassII の発現を示す OX6 に染まるマクロファージの数も経時的に増加した。

結論: 筋層内の組織常在型マクロファージは LPS 刺激により活性化され iNOS を発現し、これにより産生された NO は平滑筋の収縮を抑制した。また同時にこれらマクロファージは抗原提示能を増強し、免疫反応も惹起した。

- P-17.** 平滑筋ミオシンは非リン酸化のままでもミオシン軽鎖キナーゼにより活性化を受けうる
群馬大学・医学部・薬理学教室
叶 麗虹、岸 博子、中村彰男、小浜一弘

ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)には以前よりミオシンをリン酸化させる作用(キナーゼ作用)の他に、アクチンとミオシンの超沈殿を引き起こす作用(レオトニン作用)があると提唱されていた(1)。しかし、キナーゼ作用がどの程度混入しているか? という点に疑問が残っていた。しかし、今回、キナーゼ・ドメインを欠いたMLCKを発現蛋白質として得る(2)ことによりこれを解決した。そして、MLCKはキナーゼ作用を介さなくともアクチン・ミオシン相互作用を促進し得ることを明らかにした。ただし、促進の機序はこれまで提唱されていたものとは相当異なる。

— 実験結果 —

- i) MLCKのうち、キナーゼ・ドメインを含まないC末端1/3 (Asp777-Glu972)につき、これを発現蛋白質として大腸菌内に発現させ、精製した。この蛋白質は予めリン酸化させた平滑筋ミオシンには作用はなく、非リン酸化ミオシンにのみそのアクチン活性化ATPase活性に $K_m=1.06 \mu M$ 、 $V_{max}=7.46$ 倍の促進作用を及ぼした。この促進作用は二ワトリ砂のう及び牛胃より精製したMLCKでも確認された。
- ii) この促進作用は Ca^{2+} とカルモジュリンを要求しなかった。
- iii) この作用はミオシンを経由してなされた。
- iv) この作用はAla796-Ser815の配列に局在した。

文献：(1) Kuwayama, H., Suzuki, M., Koga, R. and Ebashi, S. (1988) J. Biochem. 104: 862-866. (2) Kohama, K., Ye, L.-H., Hayakawa, K., and Okagaki, T. (1996) Trends Pharmacol. Sci. 17: 284-287.

- P-18.** 等尺性収縮を発生する培養平滑筋組織標本の構築とその収縮反応性
明治薬科大学薬理学教室
一色 靖洋、大石 一彦、内田 幸宏

培養平滑筋細胞の収縮性を測定することは、平滑筋の収縮機構や分化の研究において極めて有効な手段となりえる。我々は、コラーゲンゲルにモルモット胃底部由来の培養平滑筋細胞を包埋して機械的な緊張を負荷することで、典型的な収縮性アゴニストに対して収縮張力を発生する紐状の平滑筋組織標本を構築することができた。そこで、この平滑筋組織標本の等尺性収縮がどの程度平滑筋組織の収縮を反映したもののなのかを調べ、本標本の平滑筋研究への応用の可能性をさぐることを目的とする。

培養平滑筋細胞は、モルモット胃底部より単離後培養に供したものをを用いた。コラーゲンゲルに培養平滑筋細胞を包埋して長軸方向の両端に2本の棒を立てた溝中で三次元培養すると、培養3日目にはゲルが収縮し細長いファイバー状に再構築され、それに伴って静止張力を発生するようになった。培養7日目の等尺性収縮を測定したところ、高濃度カリウムによる脱分極や、 α アドレナリン受容体作動薬やセロトニンなどのアゴニストに反応し、用量依存性に持続性の収縮張力を発生した。競合的 α 受容体拮抗薬であるフェントラミンは、ノルアドレナリンによる用量反応曲線を右側(高濃度側)にシフトした。一方、モルモット胃底部平滑筋組織に対する典型的な収縮性アゴニストであるアセチルコリンに対しては、収縮張力を発生しなかった。そこで、m3ムスカリン受容体を強制発現させた平滑筋細胞を用いて平滑筋組織標本を構築しアセチルコリンに対する作用を検討したところ、十分な収縮張力を発生した。

以上のことより、コラーゲンゲルに包埋培養することで構築された平滑筋組織標本は、胃底部本来の収縮型形質とは異なるアゴニスト感受性を示しているものの、平滑筋が本来持ち合わせている収縮反応性の特徴を十分に獲得していることが明らかとなった。