

教 育 講 演

特 別 講 演

招 待 講 演

教育講演

平滑筋研究の今昔

西南女学院大学

栗山 熙

この10年間の平滑筋の研究は著しく進歩した。この進歩は主として遺伝子の研究の展開に依存するところが多く、受容体, ion channels や細胞内機能調節因子の新たな物質や subfamilies の存在が証明された。しかしその多く物質が如何に生体機能と関連するかについてはまだ不明な点も多い。10年前の平滑筋研究のテーマとして内皮細胞からの放出物質 (EDNO, EDHF, endothelin) の生理と病態機能, 平滑筋における Ca^{2+} 動態と Ca^{2+} sensitization と desensitization, K_{ATP} の構造と機能, 受容体の代謝 (βARK などを含めての desensitization process など), mitochondria (Mt) の apoptosis とその抑制因子 (bcl-2 family や transient permeability pore を含め), 消化管自動能と c-kit (Cajal cell) の関係や消化管運動調節因子としての PACAP などがあった。これら種々の領域の研究の現在の進歩のうち2, 3の例を取り上げて考察する。

Estrogen 受容体 (ER) は細胞膜と核内に存在し (non-genomic and genomic receptor), 受容体も α と β に分類されているが, 血管内皮細胞膜受容体 (neutrophil cell, monocyte を含め) の 17β -estradiol (ES2) による活性化は NO を産生する事が明らかになった。この現象は動脈硬化とも関連し, また中枢神経系 (特に海馬系 CA1 系) では depression や Alzheimer 病の発生とも関連するとされている。さらに内皮細胞膜 EP の活性化は MAPK や bcl-2 family とも関連すると報告されている。平滑筋弛緩と関連しての NO の作用は cGMP の産生と関連し, 細胞内 Ca^{2+} の減少と関係するとされるがその機構は充分理解されていない。しかし $4\text{Ca-calmodulin-myosin light chain kinase}$ 系を介した弛緩に関して cGMP の heat shock protein-20 に対する作用は興味ある結果である。

EDHF の発生機構については現在では4つの仮説 (epoxyeicosatrienoic acid (EET) 説, gap junction 説, K^+ 説, PLA_2 説など) があるがまだ不明な点も多い。薬理的には EET の抗炎症作用と関連して興味深い。

Mt の膜電位は形質膜との間で約 -220 mV — -250 mV であり, Mt 膜内外では -100 mV — -150 mV と測定されている ($E_{\text{K}}=30\text{ mV}$)。 K_{ATP} の興奮は脱分極をもたらし Mt 内への濃度勾配による Ca^{2+} の流入を抑制する。Apoptosis と関連してイオンとしては Ca^{2+} , Cl^- (voltage-dependent anion channel; transient permeability pore) や pH が関与する。これらのイオンの apoptosis への関与機構について紹介する。

特別講演

カリウムチャネルと細胞機能制御

大阪大学大学院医学系研究科情報薬理

倉智 嘉久

イオンチャネルは無機イオンが細胞膜を通過するための膜蛋白質である。内向き整流カリウム (Kir) チャネルはイオンチャネルとして最も単純な分子構造を持っている。しかしながら、このチャネルは細胞の静止膜電位形成、受容体依存性の細胞興奮の抑制、細胞内代謝活性による細胞興奮の制御、イオン輸送といった様々な重要な細胞機能を担っている。Kir チャネルがこのような種々の機能を担うためには2種類の制御機構が重要である。一つはチャネルポア機能の制御であり、もう一つはチャネルの細胞内での位置の制御である。

第一のチャネルポアの制御では、チャネルポアのサブユニット構成、チャネルポア蛋白と小分子やリピッドの相互作用、チャネル蛋白と他の膜蛋白間相互作用などが重要である。我々はG蛋白によるカリウムチャネルの活性化機構とスルフォニル尿素受容体(SUR)によるATP感受性カリウムチャネル (K_{ATP}) の機能制御について検討してきている。特に後者は種々のカリウムチャネル開口薬 (KCO) や経口糖尿病治療薬の作用標的としても重要である。 K_{ATP} チャネルは3種類のSURと2種類のKirチャネル (Kir6.1, Kir6.2) のヘテロ8量体である。SURの違いにより、各臓器 (膵臓, 心臓, 平滑筋, 骨格筋, 神経) でのこのチャネルの生理的役割やKCOに対する反応性が異なっている。我々は特に細胞内ADPによる K_{ATP} チャネル活性化と薬剤に対する反応性制御機構について構造レベルからの理解を目指して解析を進めている。

第2のチャネルの位置制御に関しては、我々が内向き整流カリウムチャネルの中でも、 K_{AB-2} (Kir4.1) と名付けたグリア細胞のカリウムチャネルについて検討をすすめている。Kir4.1は脳のアストロサイトや網膜のミュラー細胞に発現し、細胞膜上で特徴的な集積分布を示す。この集積分布により所謂グリア細胞のカリウムバッファー作用を担っていると考えられる。このKir4.1の集積分布にはPDZドメインを持つアンカー蛋白がkey roleを果たしていることが明らかとなった。また、このチャネルは腎尿管上皮細胞、網膜色素上皮細胞、胃壁細胞など種々の上皮細胞において、能動輸送系にたいするカリウムイオンリサイクル作用を担っていることもわかってきた。これらも、Kir4.1チャネルが細胞内での特異的に集積分布していることが重要であった。そこで、PDZアンカー蛋白の作用を種々のKirチャネルについても検討したところ、(1) 細胞膜上でのチャネルの集積作用、(2) Kirの細胞内turn-overの制御、(3) Kirのゲート機構の直接制御、という3つの作用機構があることが明らかとなった。

招待講演 1

Role of the ryanodine receptor complex in calcium release in airway smooth muscle

Cornell University

**M.I. Kotlikoff, G. Ji, M.L. Collier, K.-Y. Deng, H. Takeshima,
Y.-M. Zheng, M. Rishniw, H.-B. Xin and Y.-X. Wang**

We and others have established a link between the activation of I_{Ca} and calcium release through the ryanodine receptor complex in the urinary bladder. Unlike in cardiac myocytes, coupling between the two calcium permeant channels is not obligate and occurs via a rise in global cytosolic calcium. This calcium release is an extension of the calcium-induced calcium release (CICR) that results in “spontaneous” Ca^{2+} sparks in other smooth muscle tissues. Our recent experiments have demonstrated that ryanodine receptor-mediated calcium release is also triggered by cell stretch in urinary bladder myocytes. We have also focussed on the role of FK506 binding proteins (FKBPs) and specific ryanodine receptor isoforms on CICR in smooth muscle. FK506 and cADPR alter spontaneous calcium release in smooth muscle cells, evidence of a role of FKBPs in CICR. RYR2, but not other RYR isoforms or $InsP_3$ receptors, bind to FKBP12.6, but not FKBP12, GST fusion proteins. Experiments in FKBP12.6 knockout mice demonstrate a lack of cADPR modulation of calcium release. Finally, we have generated conditional RYR2 knockout mice in which the gene is inactivated in smooth muscle cells. The Ca^{2+} release phenotype of this mouse will be presented.

招待講演 2

Physiological Regulation of Smooth Muscle Contractile Apparatus Gene Expression

Professor of Medicine and Pediatrics University of Chicago

Julian Solway, MD

Co-Investigators

Blanca Camoretti-Mercado, PhD, Andrew Halayko, PhD,

Hong Wei Liu, MD, John McConville, MD,

Darren Fernandes, PhD, Yiping Fu, MD,

Paul Kogut, BS, Joel McCauley, BS

We developed a novel airway smooth muscle culture system that generates functionally and structurally differentiated, contractile airway smooth muscle cells. Low passage canine tracheal myocytes are plated on uncoated plastic or glass coverslips at low density, grown to confluence in 10% FBS, and then serum-deprived for up to 3 weeks. During serum deprivation, striking morphologic and functional changes emerge within 3-4 days, are fully developed by 7-10 days, and persist for at least 3 weeks. About 1/6 of cells become markedly elongated and tend to align in bundles, whereas the remaining cells become flattened and circular. Elongated serum-deprived myocytes share important biochemical, structural, and functional similarities to mature contractile cells found in intact airway tissue: i) They exhibit strong immunoreactivity for smooth muscle [sm]- α -actin, smMHC, and SM22. ii) They contain ultrastructural features typical of mature contractile smooth muscle cells, including cables of contractile myofilaments, dense bodies and membrane plaques, linear arrays of membrane caveoli, numerous mitochondria, and intercellular contacts that include zonae adherens and functional gap junctions. iii) Elongated myocytes possess punctate clusters of surface muscarinic M3 receptors, that are functionally coupled to intracellular calcium mobilization upon acetylcholine (ACh) stimulation. iv) Elongated myocytes shorten upon ACh stimulation.

In studies of the cellular and molecular determinants of smooth muscle differentiation in this system, we discovered that transcription of smooth muscle contractile apparatus genes is not constant, but rather is controlled physiologically in response to external cues and internal cell signals. In particular, the activities of the smMHC and SM22 gene promoters are high in serum-fed, subconfluent myocytes, whereas they are low in long-term serum-deprived cells. This physiological regulation of smooth muscle gene transcription is attributable to parallel changes in the transcription promoting activity of serum response factor (SRF), a protein that is known to bind to and activate transcription from several smooth muscle specific genes. In turn, we found that the transcription promoting activity of SRF is regulated in part through a previously unknown mechanism-regulated nuclear translocation of SRF. Additional studies demonstrate that SRF activity is regulated by intracellular signaling through the RhoA/Rho kinase pathway, an effect mediated at least in part through control of SRF nuclear trafficking. These findings suggest that novel interventions designed to effect long-term inhibition of SRF transcription-promoting activity in airway smooth muscle cells could prevent their synthesis of contractile apparatus proteins. The consequent anticipated weakening of airway smooth muscle might be exploited for therapeutic benefit. For example, we speculate that this approach could be employed to blunt bronchoconstriction in asthma, to reduce pulmonary artery hypertension related to pulmonary arterial vasoconstriction, and perhaps to control systemic hypertension. The real value of this potential approach remains to be tested.

Supported by NHLBI SCOR HL56399 and NHLBI HL64095.

シンポジウム

ワークショップ

パネルディスカッション

S1-1. 尿失禁の診断と治療—高齢者を対象とした診療ガイドライン案

九州大学大学院医学研究院泌尿器科

関 成人

高齢者における尿失禁の頻度は極めて高く、在宅高齢者の約 10%、病院や介護施設などに入所している高齢者では 50% 以上に尿失禁がみられるとの報告もある。我が国では、60 歳以上の高齢者の 50% 以上に尿失禁があると報告され、その実数は 300 万人から 400 万人と推測されている。尿失禁は直接生命にかかわることはないが、精神的な苦痛や日常生活での活動性低下をもたらす泌尿器科領域における代表的な QOL 疾患であり、尿失禁を軽快ないしは治癒させることで、生活範囲が広がり、より充実した生活を取り戻すことも可能である。社会的には、高齢化の進行で尿失禁にかかる費用は増大し、介護保険制度の導入や高齢者の自己負担額の増大により施設入所者の泌尿器科専門医受診は抑制がかかるようになると予想される。このような状況を考慮すると、医学的にもコスト的にも効率良く高齢者の尿失禁を診断し治療していくことが必要である。そのためには、一般医ならびに泌尿器科専門医それぞれのレベルにおける尿失禁の診断、治療の標準化を推進するシステムを形成することが望ましく、この考えの一環として提唱されているのが診療ガイドラインである。尿失禁に関する代表的な診療ガイドラインは 1992 年に米国から始めて報告され、その後も欧米を中心として複数の案が示されているが、本邦における独自のガイドライン案は提示されていない。今回紹介するガイドラインは、高齢者を対象とした尿失禁の診断・評価と治療ならびに介護方法を提示することで、一般医や看護婦および介護者レベルにおいてより効率的な尿失禁の管理を確立することを目的として、厚生科研・長寿科学総合研究事業の一環として作成された試案である。今回の発表を通して、本案に対する一般医ならびに泌尿器科医の方々のご意見とご批判を頂ければ幸いである。

S1-2. 各種抗コリン薬（頻尿・尿失禁治療薬）の薬理学的特性についての比較検討

熊本大学医学部泌尿器科

吉田 正貴, 稲留 彰人, 米納 誠, 村上 滋孝, 宮前 公一, 上田 昭一

【緒言】過活動膀胱に伴う頻尿・尿失禁に対して抗コリン薬が繁用されており、現在も新規薬剤の開発、治験が進められているが、これらの薬剤の薬理学的特性について比較検討した報告は少ない。我々は摘出ヒト膀胱平滑筋に対する各種抗コリン薬 (atropine, oxybutynin, propiverine, temiverine, vamicamide, tolterodine, KRP-197, darifenacin) の薬理学的特性について比較検討を行った。【方法】膀胱腫瘍にて摘出した膀胱の体部より平滑筋条片を作成し、これに臓器透析用プローブを刺入して、酸素化した Krebs-Henseleit 液を満たした筋浴槽内に懸垂固定して、張力変化を等尺性トランスデューサーにて記録した。Carbachol, KCl, CaCl₂, 経壁電気刺激 (EFS) 収縮に対する各抗コリン薬の作用を検討した。また、EFS を行いながら microdialysis 法にて透析液を回収し放出される acetylcholine (ACh) 量を HPLC にて測定し、これに対する抗コリン薬の作用も検討した。【結果】各薬剤は carbachol の用量反応曲線を右側移動させ、pA₂ 値による抗ムスカリン作用は darifenacin ≥ KRP-197 ≥ atropine = tolterodine > oxybutynin = vamicamide > propiverine ≥ temiverine の順であった。KCl (80 mM) と CaCl₂ (5 mM) 収縮に対する抑制作用は propiverine = temiverine > oxybutynin の順であり、その他の薬剤には抑制作用は見られなかった。各薬剤は EFS による周波数反応曲線も用量依存性に抑制した。Propiverine, temiverine, oxybutynin は EFS の atropine 抵抗性収縮の抑制作用も示したが、その他の薬剤にはこの作用は認められなかった。EFS による ACh 放出量は KRP-197 と oxybutynin の前処置により有意に減少したが、他の薬剤は影響を及ぼさなかった。【結論】ヒト膀胱平滑筋に対する各抗コリン薬の作用は異なり、これは薬剤の受容体 subtype 選択性などと関係すると考えられ、臨床においてはその特性を十分理解して使用する必要があると考えられた。

S1-3. ED (Erectile Dysfunction) 治療薬について

総合せき損センター泌尿器科

木元 康介

ED (Erectile Dysfunction) の治療は、1998年にアメリカで Sildenafil が発売されて以来、革命的に変化した。それまでの ED の治療は Prosthesis を挿入する手術を受けるか、ペニスに直接 Prostaglandin E₁ を注射するか、グロテスクな真空ポンプ式の器具を使用するかしもなく、多くの患者にとって ED の治療は大変手間のかかるものであった。しかし、1988年の Tejada らによる陰茎海綿体からの EDRF の放出の証明 (Am J Physiol 254: H459), 1991年のやはり Tejada らによる海綿体内皮から海綿体神経 (NANC 神経) からの NO の放出の証明 (J Clin Invest 88: 112) により、勃起の発現に関する細胞内情報伝達の解明がすすみ、ついには狭心症治療薬の開発の方向転換により、経口で、on demand で使用できる薬剤 Sildenafil が開発されるに至った。Sildenafil の登場により、多くの患者が外来を受診するようになり、循環器系疾患を持つ患者が ED を合併することが多いことがわかって来た。そこで最近では ED は全身の血管病変の一部 “ED=ED” (Erectile Dysfunction=Endothelium Dysfunction) として捉える考えもでてきて、昨年パースで開催された世界インポテンス学会では Cardiovascular というセッションも設けられた。

本講演では ED の疫学・病態生理から Sildenafil はもちろん、臨床試験段階にある PDE5 阻害剤も含めて、その薬理・臨床薬理について述べる。

S1-4. 前立腺癌の薬物療法

九州大学大学院医学研究院泌尿器科

古賀 寛史, 内藤 誠二

前立腺癌は典型的な高齢者癌であり、欧米に多く米国では癌死因の第2位を占めている。本邦でも近年、急速に増加しており、生活様式の欧米化や診断技術の進歩などが原因とされている。前立腺癌はそのほとんどが男性ホルモン (アンドロゲン) 依存性であり、従来より治療としてアンドロゲンを遮断し癌の増殖を抑制することを目的とした内分泌療法が行われてきた。根治的前立腺摘除術や放射線療法の進歩した現在においても、転移を認める進行前立腺癌に対する治療は内分泌療法が第一選択とされる。内分泌療法はその作用機転によりいくつかの方法に分類される。最も多く使用されているのは、LH-RH アゴニストであり、これは大過量の LH-RH を投与することにより下垂体の LH-RH レセプターを枯渇させ、結果として LH が産生されずに精巣性アンドロゲン (テストステロン) を低下させる。一方、女性ホルモン剤 (エストロゲン製剤) は、視床下部や精巣に直接作用し、テストステロンの産生を抑制する。抗アンドロゲン剤は、活性型テストステロン (ジヒドロテストステロン) とアンドロゲンレセプターの結合を競合的に阻害することにより、腫瘍細胞の増殖を抑制する。これは、精巣性アンドロゲンだけでなく副腎性アンドロゲンに対しても効力を発揮する。LH-RH アンタゴニストやジヒドロテストステロンの産生酵素を阻害する 5 α -リダクターゼ阻害剤も欧米では検討されたが、本邦では前立腺癌の治療薬としては現在のところ臨床応用されていない。一方、前立腺癌に対する抗癌剤は有効なものはないとされてきた。しかし、最近エストロゲン製剤とナイトロゲンマスタードとの合剤であるリン酸エストラムスチンとアルカロイドであるタキサンとの併用療法が注目されている。両者はともに異なる作用で細胞の微小管に作用し、細胞増殖を抑制する。このセッションでは現在行われている前立腺癌の薬物療法について概説し、さらに臨床成績を提示する予定である。

S1-5. 膀胱選択性カリウムチャンネル開口薬の下部尿路系平滑筋に及ぼす薬理作用とその臨床応用の可能性

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

寺本 憲功, 伊東 祐之

細胞内 ATP 濃度が急激に減少するとそのチャンネル活性が、増大するカリウムチャンネルの存在が報告され、以来“ATP 感受性カリウムチャンネル (K_{ATP} チャンネル)”と定義されきたが一方で近年、このカリウムチャンネルは、細胞内代謝産物によって複雑に制御され静止膜電位維持・調節に重要な生理的役割を果たしていることも明らかとなった。

この K_{ATP} チャンネルを選択的に活性化する薬剤が、カリウムチャンネル開口薬であり創薬、開発された当初より、心血管系に対する降圧作用のみならず泌尿器科領域での排尿障害、不安定膀胱及び尿失禁症等の臨床治療の可能性が強く示唆されてきた。

近年、心血管系に比し膀胱平滑筋 K_{ATP} チャンネルを選択的に活性化する数多くの新規カリウムチャンネル開口薬が、報告され高い臓器選択性を有する点で今後の下部尿路系機能異常に対する新しい治療法の糸口と期待されている。

今回のシンポジウムでは膀胱選択性カリウムチャンネル開口薬の最近の知見を交えながら膀胱平滑筋と尿道平滑筋との標的チャンネル、活性化作用等の相違点を中心に膀胱選択性カリウムチャンネル開口薬の薬理作用及び臨床応用の有効性について述べる。

S2-1. ヒルシュスプルング病無神経節腸管における増生外来神経の発生メカニズム

名古屋大学大学院医学研究科病態外科学講座小児外科

渡辺 芳夫, 安藤 久寛, 瀬尾 孝彦, 金子健一朗, 勝野 伸介, 丸井 祐二

増生した外来神経線維はヒルシュスプルング病 (H 病) の無神経節腸管に特異的に認められ, H 病の診断に応用されている。しかし, この増生のメカニズムに関して, 一定の見解が得られていないので, このメカニズムを研究した。【対象・方法】胎生 10.5 から 15.5 日の正常ラット胎仔 (n=30), および H 病 (n=7), Hypoganglionosis (n=2) と他病死した児 (n=5) を用いた。伸展および凍結切片標本の免疫染色 (PGP9.5, NFH, NFM, TH, NPY, SP, CGRP, c-Ret) で結腸の外来神経支配を検討した。透過型光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。【結果】1. ラット胎仔では胎生 12.5 日に食道周囲に, そして 13.5 日に胃壁内の迷走神経線維に NFM が陽性となった。一方で, 肛門側結腸壁内には胃壁内の迷走神経より遅く 15.5 日に肛門側から進入した NFM 陽性の外来神経が観察できた。2. H 病の結腸の粘膜下層および粘膜固有層には他病死した児の同部と比較して増生した外来神経線維を認め, これらは TH および NPY に陽性の神経が主体で, SP および CGRP 陽性神経線維は少なかった。3. Hypoganglionosis の結腸では H 病の結腸と異なり外来神経線維の増生は認めなかった。【考案】結腸の壁内を支配する外来神経支配は骨盤神経叢由来の遠心性の交感・副交感の神経線維を含む ascending nerves で, 直腸から結腸の筋層に入り, 筋層間を口側に走行する。この神経は腸管の壁内神経叢と同様に, 口側の迷走神経より遅れて結腸壁内に認められた。さらに, Hypoganglionosis の結腸では外来神経の増生を認めず, 腸管神経系の形成に関与する結腸壁内の因子が, 外来神経の増生に影響することが示唆された。【結語】H 病の無神経節腸管における増生したアセチルコリン陽性神経は骨盤神経叢由来の遠心性の交感・副交感神経が主体であり, その増生のメカニズムに結腸壁内の腸管神経系の形成に関係する時間と環境の因子の関与が推測された。

S2-2. hypoganglionosis と Hirschsprung 病移行帯部腸管との比較検討

—腸管神経節細胞の数が少ない病態について—

都立清瀬小児病院外科, 同病理¹

広部 誠一, 林 隼, 鎌形正一郎, 渕本 康史, 下野 隆一, 小寺 厚志
羽藤 晋, 佐久 間恒, 森川 征彦¹

【目的と方法】 hypoganglionosis (hypo) では腸管神経節細胞の数が少ない形態を示す。hypo の病態として, Hirschsprung 病 (H 病) の移行帯部と類似した形態を示すことから, H 病の無神経節部を欠いた不全型で神経堤細胞の遊走異常が病因と考える説がある。一方, その病因として神経節細胞が形成された後に, 細胞死が過度におこり細胞数が減少したとの説もある。一般的な細胞死の機構は, 神経栄養因子である NGF が神経細胞にあるレセプター trk と結合し神経細胞の生存を維持するが, その栄養因子の不足などの生存に不利な環境下では細胞死が起き, その際, bcl-2 などのアポトーシス調節因子が関与して細胞死を制御していると考えられている。

今回, hypo で病態を検討する目的で, 正常, hypo, H 病移行帯部腸管を対象に, 免疫組織化学的染色により, 神経細胞の骨格蛋白である neurofilament (NF), シナプスのマーカーである synaptophysin (SY), 細胞死の機構のマーカーとして trk, bcl-2 の発現を観察した。

【結果】 H 病移行帯部では神経細胞の数は少ないが, 個々の細胞での NF, SY の局在は正常対象と同様に豊富な局在を認めたが, hypo では個々の神経細胞での NF, SY の局在は乏しく神経細胞の構造に質的異常があると考えられた。trk の発現は H 病移行帯部では正常の神経細胞と同様の豊富な発現を認めたが, hypo の神経叢では減少していた。bcl-2 は正常腸管では新生児例に豊富な発現を認めたが, それ以降の時期には発現が乏しくなっていた。H 病移行帯部腸管でも bcl-2 の発現は乏しかったが, hypo では bcl-2 が異常発現している症例を認めた。

【考察】 hypo は H 病とは異なる病態であると考えられた。hypo の神経細胞では trk の発現が低下し生存に不利な環境にあり, その病態に神経細胞の細胞死が関与している可能性が考えられた。

S2-3. Hirschsprung 病における interstitial cells of Cajal の分布と平滑筋への作用

国立岩国病院小児外科

植村 貞繁, 中川 賀清

【目的】 Hirschsprung 病の無神経節結腸に interstitial cells of Cajal (ICCs) が存在することは知られているが、その分布や働きについて未知な点が多い。ICCs は腸管の pacemaker の働きをしており、腸管神経系を介して平滑筋に興奮性あるいは抑制性の作用をしていることが最近明らかになった。そこで、Hirschsprung 病腸管を用いて、無神経節結腸における ICCs の分布と壁内神経線維との関連を調べた。

【方法】 手術時に採取した 4 例の Hirschsprung 病結腸の全長にわたり、c-kit 抗体を用いて免疫組織染色を行った。また、PGP 9.5 と VIP で腸管神経系を同定し、二重染色を行うことにより、c-kit 陽性細胞と神経線維との関連を調べた。

【結果】 口側無神経節腸管には筋層間と輪状筋粘膜側に多数の神経線維がみられるが、この神経線維のほとんどは VIP 陽性である。ICCs はこの神経線維の多い部位に一致して多数みられた。特に、transitional zone に近い口側無神経節腸管では c-kit の発現が強い細胞がみられ、その突起に神経線維の varicosity が接するように認められた。肛門側結腸では ICCs の分布はまばらとなった。

【考察】 口側無神経節腸管における VIP 陽性線維は口側の腸管神経系から肛門側に降りてくる抑制性の神経と考えられるが、これは ICCs と強い相関が認められ、ICCs を介して無神経節結腸の平滑筋に抑制性の作用をしているのではないかと考えられる。従来、無神経節腸管壁内の筋層に分布する神経線維はどのような働きをしているか不明であったが、今回の結果からこの神経は ICCs へ分布し、腸管の平滑筋に働いているのではないと思われる。

S2-4. ヒトおよびラットモデルにおけるヒルシュスプルング病無神経節腸管の膜性質と神経筋伝達様式

九州大学大学院医学研究院小児外科, 同生体情報薬理¹,
Department of Physiology & Biophysics, Mayo Clinic²

窪田 正幸, 水田 祥代, 伊東 祐之¹, J.H. Szurszewski²

【目的と方法】 ヒルシュスプルング病 (H 病) における機能的腸閉塞症の病態解明のために、ヒト無神経節腸管並びに全結腸型 H 病モデルである先天性無神経節ラットを用いて、無神経節部平滑筋細胞の電気的膜性質と神経筋伝達様式を検索した。ヒト術中摘出標本ならびにラットモデルより平滑筋条片を作成し、Krebs 液灌流下にガラス微小電極法を用いて細胞内静止膜電位ならびに経壁的神経刺激に対する神経筋接合部電位を記録し、張力変化は等尺性収縮記録法を用いて記録した。また、二重蔗糖隔絶法を用いて膜電位変化と張力変化の同時記録を行った。【結果】 ヒト無神経節腸管：同じ無神経節部においても部位別相違が存在し、腹膜翻転部レベルにおける無神経節腸管の検討では ($n=8$)、静止膜電位は神経節部と差はなかったが、自発膜活動の発生頻度は減少していた。経壁的神経刺激に対しては、20% の細胞においてコリン作働性興奮性脱分極反応と収縮反応のみが認められ、抑制性神経支配は欠如していた。一方、移行帯部領域の無神経節部では ($n=5$)、自発膜活動能は良く保たれ、神経刺激に対し減弱した NANC 作働性抑制性神経接合部電位と弛緩反応が記録され、その発生頻度、振幅は狭小部に近づくにつれ低下し、狭小部ではほぼ消失していた。ラットモデル：外来性神経線維の分布する肛門縁に近い無神経節腸管の部位別相違を検索したが ($n=5$)、内肛門括約筋部においては、コリン作働性興奮性神経反応と NANC 作働性抑制性神経反応が認められ、非括約筋部無神経節部では、コリン作働性興奮性神経反応のみが認められ、その発生頻度と振幅は近位側程低下する傾向が認められた。【結語】 無神経節腸管においては膜性質ならびに神経支配様式に部位別相違が存在し、内因性神経支配は移行帯部において漸減するものの、狭小部では遠位側ほど有効に神経筋伝達を営む外来性神経支配が存在し、両因子が関連しあって本症の蠕動不全が発生しているものと結論された。

S2-5. Hirschsprung 病内肛門括約筋に対する nitric oxide (NO) の生理・薬理的検討

日本大学医学部第一外科¹, 日本歯科大学外科²

富田 涼一^{1,2}, 池田 太郎¹, 藤崎 滋¹, 越永 従道¹, 朴 英智¹, 野中 倫明¹
丹正 勝久¹, 福澤 正洋¹

目的: Hirschsprung (H) 病内肛門括約筋 (IAS) に対する NO 作用を生理・薬理的に検討した。対象と方法: H 病 8 例 (男 6 例, 女 2 例, 0.5-1.6 歳, 平均 7.1 か月) の歯状線上部内 IAS について, 直腸癌 12 例 (男 10 例, 女 2 例, 46-72 歳, 平均 54.2 歳) の歯状線上部正常 IAS を対照に mechanogram 法にて各種自律神経遮断薬, NG-L-arginine (L-NNA), L-arginine 投与前後での electrical field stimulation (EFS) 反応を検討した。結果: 1. 交感・副交感神経遮断前 EFS 反応: 対照 (n=28) では収縮反応 67.9%, 弛緩反応 32.1% であった。H 病 (n=20) では収縮反応 100% であった。H 病は対照より有意に収縮反応を示した (P<0.01)。2. 交感・副交感神経遮断後 EFS 反応: 対照 (n=28) では収縮反応 7.1%, 弛緩反応 92.9% であった。H 病 (n=20) では無反応が 100% であった。H 病より対照が有意に弛緩反応を示した (p<0.001)。3. 交感・副交感神経遮断後 L-NNA (1×10⁻⁶ g/ml) 反応: 対照 (n=28) では収縮反応が 78.6%, 弛緩反応が 10.7%, 無反応が 10.7% であった。H 病 (n=20) ではすべて無反応であった。対照では L-NNA で弛緩反応は抑制され収縮反応を示した。4. 3 の実験に引き続いての L-arginine (1×10⁻⁶ g/ml) 反応: 対照 (n=28) では収縮反応が 10.7%, 弛緩反応が 82.1%, 無反応が 7.7% であった。H 病 (n=20) では無反応が 100% であった。対照では L-arginine で収縮反応は抑制され弛緩反応が回復した。4. tetrodotoxin にて全壁内神経系遮断後 EFS 反応: 対照と H 病ともに無反応が 100% であった。結論: 正常部 IAS には, non-adrenergic non-cholinergic (NANC) inhibitory nerve が存在し, その神経伝達物質に NO が挙げられた。H 病 IAS では NANC inhibitory nerve および NO が欠如していた。H 病 IAS の motility 異常に NANC inhibitory nerve およびその神経伝達物質である NO の欠如が示唆された。

S2-6. ヒルシュスプルング病: 増生した外来神経の病態と病因および遺伝子異常の解析

杏林大学医学部小児外科, 同生化¹, 同生理²

韭澤 融司, 伊藤 泰雄, 阪井 哲男¹, 赤川 公朗²

ヒルシュスプルング病の無神経節部腸管で増生している外来神経の病態に関して電顕を用いた形態学的な検討と薬理的検討を, 神経増生の原因を探るために神経発芽を抑制的に制御している蛋白質 HPC-1 の免疫組織学的検討を行った。また本疾患の発生原因を探求するため遺伝子異常を解析した。

【対象および方法】 電顕的検討は 5 例, 薬理的検討は 6 例, 組織化学的検討は 7 例を対象とした。また遺伝子異常の解析は sporadic に発症した 28 例を検索した。電顕的検討は AChE を染色した後, 透過電子顕微鏡にて観察した。薬理的検討は無神経節部筋条片の電気刺激に対する反応を観察した。HPC-1 は関連蛋白質を含め免疫組織化学染色を行い光顕にて観察した。遺伝子の解析は ① RET ② EDNRB ③ EDN3 ④ GDNF ⑤ NTN の 5 種の遺伝子についてその DNA 配列の解析を行った。

【結果】 筋層間に侵入した神経線維の神経終末は平滑筋細胞に 200 nm 以下の間隙を介して近接していた。神経刺激条件の電気刺激によりコリン作動性神経を介した収縮反応を示し, 非アドレナリン非コリン作動性抑制性神経の反応は欠如していた。HPC-1 では増生した神経線維は染色されなかった。RET では 6 種類 7 個, EDNRB では 3 種類 5 個, GDNF で 1 種類の変異をそれぞれ発見した。

【考察】 ヒルシュスプルング病無神経節部では外来性のコリン作動性神経線維が増生し直接平滑筋細胞に接合・作用すること非アドレナリン非コリン作動性抑制性神経の欠損とあわせ腸管は先進線維優位となり収縮すると考えられた。また神経発芽を抑制的にコントロールしている HPC-1 の含有量が少ないため, 神経線維の発芽が促進された状態であるため外来神経線維が増生している可能性が示唆された。遺伝子異常の発現頻度は RET 14.3%, EDNRB 10.7% であり, 異常の発現頻度はそれ程高いものではなく, 今回検索した 5 種の遺伝子異常だけでは本症の発症を説明できないと思われた。

S3-1. 受容体活性化される Ca チャネル群の分子の実体と生理学的・病理的意義と展望

岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境研究領域

森 泰生

形質膜越えの Ca 流入は、主要な細胞内 Ca イオン濃度調節機構の一つであると同時に、膜電位の脱分極を担うという生理的意義を有する。なかでも、受容体活性化される Ca チャネル (Receptor-activated Ca channel) (RACC) 群が注目を集めつつある。しかしながら、本機構は非常に多様な上、各 RACC サブタイプの選択的かつ高親和的な阻害剤がないことから、機能同定や分子的・生化学的解析が極めて困難であった。そのため、平滑筋のみならず多くの組織・細胞において、RACC の生理学的・病理的意義に関しては未解明な課題が多い。RACC 研究にアプローチすることにより我々が得た、最新の知見のいくつかを紹介したい：1) RACC の分子の実体である TRP が、カプサイシン受容体等を含む他の相同タンパク質とともに、非常に大きなスーパーファミリーを形成している。2) 7つの TRP は、protein kinaseC 非依存的に diacylglycerol によって活性化される TRP3, 6, 7, Ca によって活性化される TRP5, Ca ストアの枯渇に関連した容量性カルシウム流入を調節する TRP1 等、に機能分類される。3) TRP1 は IP_3 受容体を機能修飾する。4) 血管平滑筋における TRP6, B細胞における TRP1 等、それぞれの TRP が特異的な生理学的役割を担っている。5) ニコチンアミドを介して、数 $10 \mu M$ の H_2O_2 によって活性化開口する新規 Ca チャネル ROSC1 を同定した。TRP 関連チャンネルのこのような分子・機能的多様性は、特定の生体応答の惹起に必要な、Ca シグナル及び膜電位変化の空間的・時間的パターン制御の重要な基盤であると考えられる。

S3-2. エンドセリンにより活性化される Ca^{2+} 透過性チャンネルの薬理学とその調節機構

北海道大学大学院医学研究科情報薬理

三輪 聡一, 深尾 充宏, 川那辺吉文

エンドセリン-1 (ET-1) の血管収縮作用は細胞外からの持続的な Ca^{2+} 流入によるが、この Ca^{2+} 流入は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VOCC) 以外の Ca^{2+} 透過性チャンネルによる。ET-1 は血管平滑筋細胞において、3種類の Ca^{2+} 透過性チャンネル—2種類の Ca^{2+} 透過性非選択的陽イオンチャンネル (NSCC-1 および NSCC-2 と命名) とストア作動性 Ca^{2+} チャンネル (SOCC)—を活性化する。これらのチャンネルは、LOE 908 (NSCC-1 および NSCC-2 の遮断薬) および SK & F 96365 (NSCC-2 および SOCC の遮断薬) という2種類の遮断薬で薬理的に区別できる。ET タイプ A および B 受容体を安定的に発現した CHO 細胞 (CHO/ET_AR および CHO/ET_BR と表記) を ET-1 で刺激すると、CHO/ET_AR では薬理的に上記3つのチャンネルが活性化されるが、CHO/ET_BR では NSCC-1 および NSCC-2 のみが活性化された。チャンネルの活性化機構を明らかにするために、変異受容体を作製した。Gq とのみ共役する受容体を用いた場合には、NSCCs は活性化されず SOCC だけが活性化され、G 蛋白質との共役のない受容体ではチャンネルの活性化は起こらなかった。また、G12 の dominant negative 変異体では、NSCCs の活性化が失われ、G13 の変異体では影響はみられなかった。これらの結果から、1) ET_AR は NSCC-1, NSCC-2 および SOCC を活性化するが、ET_BR は NSCC-1, NSCC-2 のみを活性化する、2) SOCC の活性化は Gq を介し、NSCCs の活性化は G12 タンパク質を介しておこる、ことが明らかになった。

S3-3. 脂質メディエーターと Ca 流入機構：細胞増殖を制御する機能分子群としての働き

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学

村木 克彦, 大矢 進, 今泉 祐治

血管平滑筋や内皮細胞をはじめ、細胞の分化増殖は様々な因子により多様に制御されている。細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の増減はその因子の一つであり、細胞増殖制御への関与が強く示唆されているが、その Ca 動員機構には不明な点も多い。一方、最近血漿中に存在する一部の長鎖脂質メディエーターが、血管平滑筋や内皮細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を増加させること、また強力な細胞増殖活性を有すること、などが明らかとなってきた。本研究では、スフィンゴシン 1 リン酸 (sp1p) 及びその関連脂質の Ca 動員機構について検討した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECS) に 10 nM~1 μ M の sp1p を投与したところ、約 70% の細胞で、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察され、その 50% 有効濃度は約 100 nM であった。外液の Ca を除去すると、sp1p 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、観察されなかったが、Ca の添加により有意な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が引き起こされた。一方ヒスタミン (His) やブチルヒドロキノン (BHQ) は細胞内 Ca 貯蔵部位の枯渇と容量性の Ca 流入経路 (SOC) の活性化を引き起こした。チロシンリン酸化酵素阻害薬は sp1p 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に無効であったが、HUVECS を百日咳毒素 (PTX) で処理すると、sp1p 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は消失した。一方、細胞を保持電位 -50 mV に固定し、sp1p を投与したところ、 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に先行して内向き電流が活性化された。この電流の逆転電位は約 20 mV であった。さらに、ピペット内に 0.3 μ M sp1p を添加し、inside out パッチ膜を作製すると、17pS のカチオン透過性チャネルが観察された。このチャネル活性はパッチ内膜側への GTP や GTP γ S の添加により影響を受けた。一方ジアシルグリセロールアナログにより、一部の細胞では $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察されたが、この反応と sp1p 誘発反応とは無関係であった。Sp1p は PTX 感受性 G 蛋白を介して、SOC とは別のカチオンチャネルの開閉を制御している可能性が高い。

S3-4. 平滑筋受容体作動性 Ca チャネルの分子実体

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理,
岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境研究領域¹

井上 隆司, 森 泰生¹, 伊東 祐之

内臓の多彩な機能の調節には、その主要な構成要素である平滑筋に対する自律神経やホルモン、オータコイドによる受容体を介した制御が重要な役割を果たしている。これらの受容体の殆どはイノシトールリン脂質代謝回転等と関連した G 蛋白質共役型の代謝型受容体 (G-protein coupled receptor: GPCR) である。多くの平滑筋組織において、GPCR が刺激されると細胞内貯蔵部位から Ca 放出が起こると同時に細胞外から持続的な Ca^{2+} 流入が直接的・間接的に惹起され、その結果、組織の運動性や緊張性が変化する。しかしこのような重要性にも関わらず、受容体刺激に伴う Ca 流入経路 (receptor-operated Ca^{2+} entry channel: ROCC) の分子実体は最近まで全く不明であった。本シンポジウムでは、少なくとも一部の平滑筋 ROCC (血管の α_1 -アドレナリン作動性 Ca^{2+} 流入) には、ショウジョウバエの光情報伝達異常から同定された TRP 蛋白質 (transient receptor potential protein) のホモログ TRP6 が必須の構成分子として密接に関与していることを、電気生理学的・分子生物学的・免疫組織化学的手法によって検証する。更に、他の平滑筋組織の ROCC と TRP 蛋白質の分子レベルでの対応の可能性についても、文献的考察も加えながら検討する。

S3-5. 血管の内膜肥厚に関する平滑筋細胞の遊走および増殖の制御 —カルシウムイオンの役割—

昭和大学薬学部病態生理, 国立嬉野病院病理¹

清水 俊一, 内藤 慎二¹

虚血性心疾患の治療に経皮的血管形成術 (PTCA) が行われ, 飛躍的な治療成績を治めているが, PTCA 後には再狭窄が生じ問題となっている。再狭窄は, 通常中膜に存在する血管平滑筋細胞が内膜に遊走し増殖することにより引き起こされる。その機構の1つとして, PTCA を施行することにより血管内皮の傷害が起こり, その傷害部位へ凝集した血小板より platelet-derived growth factor (PDGF) が分泌され, 平滑筋細胞の遊走や増殖が惹起されると考えられている。平滑筋細胞の内膜への遊走には細胞外マトリックスの分解が必須であり, この過程には matrix metalloproteinases (MMPs) が重要な役割を演じている。また, MMPs の発現制御に関与する転写因子として ETS-1 がり, その発現には細胞外 Ca^{2+} は必要ではないが, 細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位である小胞体の Ca^{2+} が重要な役割を演じているようである。一方, PDGF による血管平滑筋細胞の増殖には細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入が重要であり, この流入は, 電位依存性 Ca^{2+} チャネル拮抗薬では部分的にしか抑制されないことから, 膜電位非依存性 Ca^{2+} チャネルを介していると考えられる。膜電位非依存性 Ca^{2+} チャネルの分子実態は長く不明であったが, 近年その本体として transient receptor potential protein (TRP) が注目されている。最近, TRP1 が血管平滑筋細胞において容量性 Ca^{2+} 流入を担っている可能性や TRP1 による Ca^{2+} 流入が細胞増殖に関与している可能性が相次いで報告された。TRP チャネルの機能変化が小胞体の Ca^{2+} 濃度を制御している可能性も考えられる。今回は, 血管平滑筋細胞の遊走および増殖における Ca^{2+} の役割について考察する。

W-1. 細胞はいかにしてイノシトールリン脂質を利用するか：PI代謝系の進化

姫路工業大学大学院理学研究科生命科学

八木澤 仁

グリセロリン脂質の一種であるイノシトールリン脂質 (PI) は、細胞膜脂質としてはマイナーな成分である。しかし、細胞の内外での情報伝達におけるこの脂質ファミリーの役割は極めて重要である。ヘッドグループであるイノシトール環の OH 基は、エステル結合によりリン酸と結合することができ、通常の細胞内の条件では、リン酸化 PI は膜に極めて強い負の電荷を賦与する。このためリン酸化 PI は単分子でも、あるいは、膜上のクラスターとしても、正電荷を持ったタンパク機能ドメインに対する静電的相互作用の場として機能する。リン酸化イノシトール環の構造異性体のバリエーションは、それらと多くのタンパクとの群特異的相互作用を保証する。最近、PH ドメイン、ENTH ドメイン、FYVE ドメインなど、PI に結合する新規の機能ドメインを持つタンパクが次々に報告されており、それらの細胞内局在およびその変化、結合の特異性、細胞内での機能等について解析が加えられつつある。ヒトゲノム解析結果から予測される PH ドメイン様の構造を持つタンパクをコードする遺伝子の数は約 200 であり、非転写因子をコードするものの中では Ig 様モチーフに次いで多く存在する。一方、細胞内には種々の PI 修飾 (リン酸化、脱リン酸化、加水分解) 酵素や PI 転移タンパクが存在するが、これらは単に PI の代謝制御に重要であるばかりでなく、各々の PI が果たしている細胞内機能の制御にも重要である。この中で、PtdIns(4, 5)P₂ を加水分解するホスホリパーゼ C (PLC) は、Ins(1, 4, 5)P₃ と DAG という 2 つの二次メッセンジャーを産生する以外に、PtdIns(4, 5)P₂ が担っている細胞の増殖や形態・運動性の制御機能を修飾するキーエンザイムである。PLC ゲノム遺伝子は酵母では 1 つだが、ヒトでは 11-12 個が存在することが報告されており、そのほとんどの cDNA がすでに得られている。今回は PLC による細胞形態や運動性の制御についても考察する。

W-2. イノシトール 1, 4, 5 三リン酸レセプターと生理機能

東京大学医科学研究所脳神経発生分化分野, 理化学研究所脳科学総合研究センター

御子柴克彦

外界の刺激が細胞に伝達されるとセカンドメッセンジャーが産生され、細胞の生理機能を引き起こす。イノシトール 1, 4, 5 三リン酸レセプター (IP₃) および Ca²⁺ は細胞内の重要なセカンドメッセンジャーとして、知られている。Ca²⁺ は細胞にとっては有害な金属イオンであるために細胞内は 10⁻⁷ M に保ち細胞外との間に 10,000 倍の濃度差をつくっている。従来は細胞外からの Ca²⁺ 流入が重要な役割を全て果たしていると考えられていたが、近年、細胞内に小胞体としての Ca²⁺ の貯蔵庫からの放出にとり IP₃ レセプターが重要な役割をはたしていることが明らかとなってきた。これまでに、IP₃ レセプターを介した小胞体からの Ca²⁺ 放出が、受精、細胞分裂、背腹軸形成、神経可塑性などの多様な機能に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた。IP₃ レセプターは、313 KD の巨大な蛋白質であり、N 末端側に IP₃ 結合部位、C 末端側がチャネル領域、中央部分が他の情報伝達系とのカップリング領域となっている。ヒト、ラット、マウス、カエルには 3 種のアイソフォームがあり、タイプ 1 型は平滑筋とニューロンに強く発現している。しかしショジョーバエ、線虫、ヒトデでは、一種のみである。すでにこれまでに、IP₃ レセプターは細胞内カルシウム動態に重要な役割をしていることが明らかになっている。IP₃ レセプターの基本的な役割は Ca²⁺ 振動を引き起こす重要な役割を有しており、そのために IP₃ レセプターは通常のレセプターとは異なる大変ユニークな性質を有していることが明らかとなってきたので、これらのデータも含めて最近の知見を紹介する。

W-3. リアノジン受容体及びイノシトール 1, 4, 5 三リン酸受容体を介した細胞内局所 Ca^{2+} 遊離によるイオンチャネル活性制御機構

名古屋市立大学大学院薬学研究所細胞分子薬効解析学

今泉 祐治

細胞内局所における Ca^{2+} 濃度の変動は、 Ca^{2+} ウェーブや Ca^{2+} オシレーション等の細胞全体の Ca^{2+} 濃度変化の因子（起点や伝播中継点）として重要であるのは論を待たないが、局所だけの一過性 Ca^{2+} 濃度上昇も、重要な生理的意義を有することが明らかとなってきた。特に平滑筋において他の組織に先駆けて Ca^{2+} スパークによる Ca^{2+} 依存性イオンチャネル（BK チャネル等）活性制御機構が示された意義は大きい。さらにリアノジン受容体を介する Ca^{2+} スパークだけでなく、 IP_3 受容体を介した Ca^{2+} パフによっても同類のイオンチャネル活性制御機構が機能することが示されている。これら細胞内局所 Ca^{2+} 遊離による細胞膜上のイオンチャネル活性制御は、細胞膜に接合した特定の小胞体上の Ca^{2+} 遊離チャネルと細胞膜上のイオンチャネル間の機能的な連関によっている。非興奮性細胞では IP_3 受容体が主要な Ca^{2+} 遊離チャネルなので、HEK293 細胞等の非興奮培養性細胞に BK チャネルを高発現させると Ca^{2+} パフによるチャネル活性化が観察できる可能性がある。確かに低濃度のアゴニスト存在下で律動的な BK チャネル電流活性化が観察される場合があった。一方、本来機能発現していないリアノジン受容体を BK チャネルと共発現させたところ、 Ca^{2+} スパークでトリガーされる自発性 Ca^{2+} オシレーションとそれにほぼ同期した BK 電流の発生が観察された。この系でリアノジン受容体と BK チャネルが高い機能的連関を持つ場合もあったが、多くは弱い連関を示した。また Ca^{2+} オシレーションの細胞内伝播には IP_3 受容体も寄与している可能性が高いことが判った。局所 Ca^{2+} 遊離によるイオンチャネル活性制御機構を解明する上で、小胞体と細胞膜の接合部形成と機能的連関に必要な要因を明らかにすることが当面の課題であろう。

W-4. モルモット胃平滑筋の緩電位発生における IP_3 の関与

名古屋市立大学医学部生理

鈴木 光, 鬼頭 佳彦, 福田 裕康, 山本 喜通

モルモット胃体部平滑筋は、輪走筋のみの標本にしても律動的に緩電位や活動電位を発生しており、その歩調取りは筋層内間質細胞が行っていると報告されている。輪走筋の微小標本（単一筋束、長さ 100-150 μm ）を作成し、2本の微小電極を異なる細胞に刺入し、一つの電極から通電し、歩調取り電位を模倣し、他の電極で膜電位変化を記録し、通電により誘発される緩電位の潜時を測定した。刺激しない状態で緩電位は毎分 0.5-3 回発生した。1-3 秒パルス (1-5 nA) で脱分極させると緩電位と活動電位が誘発され、nifedipine は活動電位のみを抑制した。Nifedipine 存在下で通電により誘発される緩電位の潜時は 5 秒程であったが、CPA や thapsigargin は自発緩電位の頻度を低下させ、通電により誘発させた緩電位の潜時を延長させたので、筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離が緩電位発生には必要であると考えた。2-APB は自発緩電位の発生頻度を低下させ、通電により誘発される緩電位の潜時を延長させた。また、caffeine は膜をわずかに過分極させ、緩電位の頻度を低下させ、誘発緩電位の潜時を延長させた。一方 ACh は自発緩電位の発生頻度や振幅を増大させ、また誘発緩電位の潜時を短縮させた。そこで、通電による脱分極が IP_3 産生を促進させ、筋小胞体から Ca^{2+} を遊離させることにより緩電位が発生すると考えた。誘発緩電位発生の潜時は ryanodine により著明に変化しなかったため、 Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構の関与は大きくないと推定した。これらの結果は、平滑筋細胞膜の脱分極により産生された IP_3 が筋小胞体から Ca^{2+} を遊離させる過程が緩電位発生の初期において起こっていることを示唆していると考えた。

W-5. イノシトール三リン酸受容体を介する平滑筋細胞内カルシウムダイナミックス

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理

飯野 正光

血管平滑筋の収縮は、交感神経系、レニン・アンジオテンシン系、内皮由来弛緩/過分極因子によって制御され、血圧をコントロールしている。正常なコントロールからの逸脱は、高血圧などの病態を生じさせる。我々は、平滑筋収縮制御に重要なカルシウムシグナル系について、特に細胞内カルシウムストアからのカルシウム放出に注目して研究してきた。この研究では、蛍光カルシウム指示薬を負荷したラット尾動脈摘出標本を用い、共焦点顕微鏡あるいは CCD カメラを装着した蛍光顕微鏡によって細胞内カルシウム濃度を測定している。これにより、組織中において個々の平滑筋細胞内カルシウム濃度変化を経時的にモニターできるので、細胞集団中での現象を細胞レベルで解析できる大きな利点がある。

このような実験系を用いて、交感神経伝達物質のノルアドレナリンと ATP に応じた特徴的な細胞内カルシウム濃度変化を観察し、特にノルアドレナリンはイノシトール三リン酸受容体を介したカルシウム・ウエーブ/オシレーションを起こすことを明らかにしてきた。更に最近、外因性の刺激がない状態でもアンジオテンシン系阻害薬によって抑制される、自発的なカルシウム濃度変化（カルシウムリプル）を発見した。カルシウムリプルで見られるカルシウム濃度変化は、アンジオテンシン II による反応に酷似しているが、その成因はまだ明らかでない。このようなカルシウムダイナミックスが高血圧モデル動物や、レニン・アンジオテンシン系を構成する分子のノックアウトマウスでどのように変化するかについて解析を進めている。

W-6. 新しい $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 結合蛋白質 (PRIP) の役割

九州大学大学院歯学研究院口腔細胞工学, 同医学研究院生体情報薬理¹

兼松 隆, 竹内 弘, 土井良順子¹, 大池 正宏¹, 平田 雅人

PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) とは、我々が見いだした分子量 130,000 の新しい $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 結合蛋白質である。遺伝子クローニングによりこの分子は PLC- $\delta 1$ 類似蛋白質であることが判明したが、名前の由来になったように PLC 酵素活性を持たない。

$\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ は、この分子のプレックストリン相同領域 (PH ドメイン) に結合することから、我々は、この分子が $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3\text{-Ca}^{2+}$ シグナリング系に及ぼす影響を調べ、細胞刺激によって産生された $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ と細胞質中で結合することで $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 受容体へのシグナル入力を抑制することを明らかにした。また、PRIP に結合した $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ は $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 代謝酵素による代謝を遅延させることから、 $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ シグナルを持続させる働きも有すると考えられる。さらに最近 Yeast two-hybrid で PRIP 相互作用分子をスクリーニングしたところ、プロテインホスファターゼ 1 (PP1) をみいだした。PP1 は PRIP の PH ドメイン直前部位に結合した。PP1 と PRIP の結合に $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ は関与しなかったが、PP1 が PRIP と複合体を形成するとホスファターゼ活性が抑制されることをみいだしている。なお PP1 はミオシン軽鎖の脱リン酸化に関与することが分かっている。

本ワークショップでは、 $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ と脱リン酸化酵素 (PP1) のシグナリングを調節する新しい $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 結合蛋白質 (PRIP) が担う役割について論じたい。

P-1. cholinergic & adrenergic : 抗コリン薬の基礎と臨床応用

秋田大学医療技術短期大学理学療法学科

塩谷 隆信

気道平滑筋において、副交感神経伝達物質アセチルコリン (ACh) が働く受容体はムスカリン受容体 (Receptor ; R) で、M1 から M5 サブタイプに細分化されている。ヒト気道では、興奮性 M1R が迷走神経節に、抑制性 M2R が迷走神経終末に、興奮性 M3R が上皮細胞や分泌腺、気管支平滑筋に分布している。ムスカリン R 拮抗薬は抗コリン薬とよばれ、atropine がその代表であるが M1-M3R に対する選択性はみられず、その後開発された ipratropium, flutropium, oxitropium は atropine と異なり 4 級アミンであることから、脂溶性で気道粘膜からの吸収は低く、吸入による全身作用は発現しにくい。tiotropium は、M1-M3R への親和性が強く、M2R からの解離が早く M1 および M3R からの解離が遅いことから、長時間作動性抗コリン薬として現在臨床治験中でその成果が期待されている。

近年、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) における抗コリン薬の位置付けについて、ATS のガイドラインでは、段階的薬物療法の使用順位として、軽度～中等度の症状が継続する場合のステップ 2 に ipratropium の MDI を推奨している。しかし、COPD における抗コリン薬の有用性の報告は多く、本薬は COPD の第一選択治療薬としてステップ 1 の軽症から広く使用されるべきである。一方、気管支喘息において抗コリン薬の有用性の EBM が確立されているのは、重症喘息発作時における β_2 刺激薬との併用効果だけである。わが国においては、より効果的な作用発現のため、ネブライザーで使用可能な抗コリン薬の開発が急がれる。抗コリン薬が有効と考えられる喘息の病態として、① 老年喘息、② 喘息合併 COPD、③ 運動誘発性喘息、④ 夜間喘息があるが、その有用性については、今後、無作為比較対照試験による検討が必要である。以上、国内外の抗コリン薬の最新の基礎・臨床成績を検証し、抗コリン薬の COPD と気管支喘息における有用性および限界について概説する。

P-2. peptidergic & gas : VIP, PACAP 誘導体の長時間作動性の気道平滑筋弛緩効果について

獨協医科大学小児科

吉原 重美, 有阪 治

【緒言】気道で機能している非アドレナリン非コリン作動性 (NANC) 神経は、気道平滑筋を拡張させる抑制性 NANC 神経 (i-NANC) と収縮させる興奮性 NANC 神経 (e-NANC) の 2 つである。i-NANC 神経は、副交感神経遠心路にあたり、アセチルコリンと同時に放出される NO や VIP, PACAP などのペプチドが神経伝達物質の候補として考えられている。VIP は、すでにヒトに投与した場合の気道拡張効果が報告されている。しかし、喘息患者に VIP を吸入しても軽度の拡張効果しか認めず、その理由として投与した VIP が気道に存在するペプチド分解酵素により速やかに分解されやすいことが考えられている。そこで今回、i-NANC 神経を活性化する拡張性神経ペプチド PACAP, VIP の誘導体を合成し、モルモット、サル気道平滑筋に対する弛緩作用とその持続効果について検討した。【結果】1) PACAP-27 の誘導体である BM-PACAP-27: [Arg^{15,20,21}, Leu¹⁷] PACAP-27-Gly-Lys-Arg-NH₂ は、カルバコールによるモルモット、サル気道平滑筋収縮反応に対し PACAP-27 と同等の最大弛緩反応を認めた。2) PACAP-27 は 1.5 時間以内に弛緩反応が終了するのにに対し誘導体は 6 時間にわたり弛緩持続効果を認めた。3) captopril, phosphoramidon の前処置により PACAP-27 の弛緩効果は有意に増強したのに対し、誘導体では増強効果を認めなかった。4) PACAP 誘導体は、サルプタモールと比較してカルバコール静注によるモルモット気道収縮に対して弛緩持続効果を認めた (*in vivo*)。5) VIP 誘導体である BM-VIP: [Arg^{15,20,21}, Leu¹⁷] VIP-Gly-Lys-Arg-NH₂ は、VIP と比較して 6 時間にわたり弛緩持続効果を認めた。【結論】PACAP, VIP 誘導体は長時間作動性の気道平滑筋弛緩効果を認めた。また、これら誘導体はペプチド分解酵素により不活化されにくいことが示唆された。

P-3. channel & intracellular signaling : K_{Ca} チャネルのリン酸化を中心に

東北大学医学部感染症呼吸器内科

奈良 正之

平滑筋の細胞膜には種々のイオンチャネルが分布し、膜の興奮性に寄与している。気道平滑筋はもともと興奮性の低い平滑筋に分類されるが、単一コンダクタンスの大きい Ca^{2+} 依存性 K^+ (K_{Ca}) チャネルが密に分布しており、その開口が低興奮性に寄与している。気道の収縮、弛緩は喘息の病態、治療を考える上で重要で、今回、気道平滑筋の弛緩物質である β_2 アドレナリン作動薬及び ANP が K_{Ca} チャネルに及ぼす効果について報告する。 *Xenopus* oocyte 上に K_{Ca} チャネルと β_2 アドレナリン受容体 (β_2AR)、ANP 受容体を発現させ、two-electrode voltage clamp 法を用いて検討した。 K_{Ca} チャネルと β_2AR を共に発現させ、イソプロテレノール (ISO) を投与すると K_{Ca} チャネルは活性化された。アデニル酸シクラーゼ活性化薬であるフォルスコリンを投与しても同様の活性化が認められた。また、oocyte 内に protein kinase A (PKA) regulatory subunit を注入した後 ISO を投与すると活性化は抑えられた。さらに、 K_{Ca} チャネルの 869 番目のセリン残基をアラニンに置換すると、活性化が抑制された。一方、膜型のグアニル酸シクラーゼ (GC) である ANP 受容体を ANP で刺激すると K_{Ca} チャネルは活性化された。この活性化は protein kinase G (PKG) inhibitor で抑制された。さらに、 K_{Ca} チャネルの 869 番目および 855 番目のセリン残基をアラニンに置換すると、活性化は完全に抑制された。以上より、 K_{Ca} チャネルは、 β_2AR との共役では PKA を、ANP 受容体との共役では PKG を介することが示唆された。また、PKA によるリン酸化には 869 番目のセリン残基が、PKG によるリン酸化には 855 番目と 869 番目のセリン残基が重要な役割を担っていることが示唆された。

P-4. disease model : 気道リモデリング

九州大学大学院医学研究院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¹

井上 博雅, 福山 聡, 木部 敦子, 古藤 洋, 松元幸一郎, 相沢 久道¹
原 信之

気管支喘息患者の気道では、上皮の杯細胞化、基底膜下肥厚、気管支平滑筋の過形成・肥大などの組織構築変化がみられる。このリモデリングは非可逆的気道狭窄の原因であり、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。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、気道反応に及ぼす影響を検討した。また、cysteinyl leukotriene (cysLT) や angiotensin II (AT2) は in vitro での気道平滑筋増殖に関与していると報告されている。動物モデルを用いて、in vivo での平滑筋リモデリング成立におけるこれらの内因性メディエーター拮抗薬の効果を検討した。卵白アルブミン感作マウスに、抗原を計 12 回反復吸入曝露した。組織学的には、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観察された。曝露終了 24 時間の時点での気道過敏性は 6 回から 12 回曝露後にかけて亢進がみられたが、好酸球性気道炎症はむしろ軽減した。さらに、6 回曝露群までは最終曝露終了 96 時間後には気道過敏性亢進は消失したが、12 回群では曝露終了 7 日後にも気道過敏性の亢進が持続していた。cysLT 受容体拮抗薬 (Pranlukast) や AT2 受容体拮抗薬 (Losartan) は、12 回群での気道過敏性亢進と平滑筋層肥厚を抑制したが、好酸球性気道炎症には影響を与えなかった。以上より、抗原反復吸入曝露後の気道過敏性亢進は、好酸球性気道炎症よりむしろリモデリングによるものと考えられた。cysLT や AT2 受容体拮抗薬はリモデリングの抑制に有用である可能性が示唆された。

一 般 演 題

1. 摂食障害患者の胃内臓知覚の検討

東北大学医学部心療内科, 同大学院人間行動学¹, 同医学部総合診療部²

庄司 知隆, 福土 審¹, 野村 泰輔, 佐竹 学, 遠藤 由香, 唐橋 一人
相模 泰宏, 本郷 道夫²

背景: 临床上, 神経性食思不振症 (AN) は易満腹感と心窩部不快感を, また神経性過食症 (BN) は満腹感の消失をしばしば訴える。これらの症状は, 食行動異常が胃内臓知覚を変化させた可能性を示唆する。われわれは臨床症状から, 1) AN では胃内臓知覚過敏が, 2) BN では胃内臓知覚鈍麻が存在すると仮説をたて, これを検証した。

方法: AN 9 例, BN 5 例, 年齢・性をマッチさせた健常女性 9 例に胃伸展刺激による内臓知覚測定を行った。一晩の絶食の後, ポリエチレンバックを経口的に挿入し, 胃底・体部に留置した。バロスタット装置によりバックを 1 分間に 1 mmHg ずつ拡張して胃伸展刺激を行った。胃内臓知覚は, 被験者が初めて心窩部に刺激を感じた時点を感じ覚閾値, 初めて心窩部不快感あるいは心窩部痛を訴えた時点を不快閾値と定義した。それぞれの閾値におけるバッグ内圧, バッグ容量および理論上の胃壁 tension を算出し評価した。

結果: AN と健常者では, 各閾値圧には差は認められなかった (感覚閾値: 平均 8.0 vs. 11.0, 不快閾値: 平均 9.9 vs. 12.8 mmHg)。また, 両群で, 各閾値における胃容量および胃壁 tension にも差はみられなかった。一方, BN では, 健常者に比して各閾値圧は著明に高値であった (感覚閾値: 平均 17.2 mmHg, 不快閾値: 平均 20.4 mmHg)。さらに BN では, 健常者に比して各閾値時の胃容量 (感覚閾値: 平均 809 vs. 294, 不快閾値: 平均 895 vs. 415 ml) と, 胃壁 tension は高値であった。

結語: AN の胃内臓知覚と胃容量は同等であった。BN では, 胃内臓知覚鈍麻と胃容量の増加が認められた。過食行動による胃内臓知覚の変化が示唆された。

2. Functional dyspepsia と過敏性腸症候群の 24 時間十二指腸運動

東北大学医学部心療内科, 同大学院人間行動学¹, 同医学部総合診療部²

唐橋 一人, 野村 泰輔, 佐竹 学, 遠藤 由香, 庄司 知隆, 相模 泰宏
福土 審¹, 金澤 素¹, 本郷 道夫²

(目的) Functional dyspepsia (FD) と過敏性腸症候群 (IBS) は, それぞれ胃, 大腸の運動異常が病態の重要な要素となる。その中で, 互いに症状が重複する症例, 移行する症例があり, 主症状以外の消化管での検討も病態を考える上で有用な情報を得られる可能性がある。そこで FD と IBS の十二指腸運動について検討した。

(方法) FD 12 例, IBS 26 例, 健常者 9 例を対象とした。十二指腸水平脚の運動を 24 時間内圧センサーを用いて記録した。覚醒・睡眠時における interdigestive motor complex (IMC) の出現回数, 食後の motility index (MI) を計測した。

(結果) 覚醒時の IMC において, 健常者と比較して, FD, IBS では出現回数の減少を認めたが, 睡眠中の IMC の出現回数には差を認めなかった。昼食後および夕食後の MI は健常者と比較して FD では低値で推移した。

(結論) FD と IBS ではともに覚醒時においてのみ IMC の出現頻度の減少を認めた。睡眠時にはこの変化が消失したことより, 機能的消化管疾患における IMC の変調には精神活動の関与が考えられた。また, FD では健常者 IBS と比較し食後の MI が低値で推移し, FD の病態との関与が考えられた。

3. CRH 末梢投与前後での胃運動と自律神経機能の変化の検討

東北大学医学部心療内科, 同総合診療部¹

相模 泰宏, 野村 泰輔, 佐竹 学, 遠藤 由香, 庄司 知隆, 唐橋 一人
本郷 道夫¹

【背景】ストレスは消化管運動機能に多大な影響を与える。corticotropine releasing hormone (CRH)はそのメディエーターとなる可能性がある。CRHの薬理作用として、動物ではCRHの中枢・末梢投与で胃排出が遅延し、ヒトではCRHの末梢投与で小腸・大腸運動が亢進する。【目的】CRHの末梢投与が自律神経系及び胃運動に与える影響をホルター心電図と胃電図、胃前庭部での消化管内圧測定にて検討する。【対象】18~25歳の健康人13名(男性10名,女性3名)。【方法】安静臥位を保ち空腹時にCRH 100 μgを静脈内投与する。CRHの投与前20分間と投与後120分間での心拍変動及び胃運動の変化を20分間単位で比較した。ホルター心電図ではLF/HFを比較し、胃電図では周波数を、normogastria (2.4~3.6 CPM), bradygastria (~2.4 CPM), tachygastria (3.6~CPM)とし、各々の時間帯での周波数帯の割合を比較した。前庭部の内圧測定では、motility index (M.I.)を比較した。

【結果】

	Pre-CRH		Post-CRH	
	-20~0 min.	0~20 min.	20~40 min.	40~60 min.
BRADY. (%)	25.7+/-24.9 ⁺	18.6+/-18.4	17.1+/-24.8	27.9+/-29.9
NORMO. (%)	68.6+/-31.2 ⁺	81.4+/-18.4 ⁺	82.9+/-24.8	70.7+/-31.7
M.I. (mmHg・%)	66.1+/-85.7 [*]	126.8+/-178.5	51+/-102.5	86.1+/-115.5
LF/HF	1.73+/-1.1	2.34+/-2.4	1.53+/-0.8	1.42+/-0.8

⁺^{*}^{*}: P<0.05 (V.S. Pre-CRH)

【結論】健康人においてCRHの末梢投与は胃の運動機能に対し影響を及ぼす。

4. ストレス負荷時の胃電図と心電図

新潟大学医学部生理第二

本間 信治

序：消化器症状を訴え心身医学外来を受診する患者に星像の鏡像をペンでなぞる Mirror Drawing Test (MDT)を行い、胃電図とホルター心電図を記録、ストレスと心身相関について検討した。対象：神経性食欲不振症5例, 心気障害2例, 過敏性腸症候群2例, 疼痛性障害3例, 特定不能摂食障害1例, その他3例の16例, 男性4, 女性12例, 年齢は36.4±14.7歳であった。方法：ストレス負荷としてMDTを、食事負荷としてカロリーメートを摂取させた。R-R間隔のスペクトルよりLF/HF (LF=0.039-0.148, HF=0.148-0.398 Hz)を計算、交感神経系活動の指標とした。心理因子の評価には、質問紙, 1) Hospital Anxiety (A) and Depression (D) Scale (HADS), 2) Somatosensory Amplification (S) Scale (SSAS)に解答してもらった。結果：心か部の胃電図の周波数分析での3 cpmのピークがMDTで2倍以上になったX群 (10.6±5.62, mean±SE, n=6)と2倍未満のY群 (0.69±0.139, n=10)に分類すると, X群の食事負荷後の胃電図のピーク比(12.7±9.01), 安静時とMDT負荷時のLF/HFの比 (1.9±0.51)はY群 (3.1±1.16, 1.2±0.20)より大きかったが有意差はなかった。X群のA (6.0±1.76), D (5.6±1.81), S (29.3±0.63)ともY群 (A=9.1±1.23, D=7.1±1.21, S=34.1±2.33)より小さかったが有意差はなかった。安静時とMDT負荷時のLF/HF比が1.5以上になったP群 (2.2±0.25)と1.5未満のQ群 (0.79±0.129)に分類すると, 胃電図ではMDT (7.1±5.26), 食事負荷 (13.2±8.27)ともP群がQ群 (2.7±1.39, 1.2±0.35)より大きかったが有意差はなかった。しかし, A (4.5±1.52), D (4.3±1.17)ともP群はQ群 (A=9.8±0.54, D=9.7±0.72)より有意に小さかった。SもP群がQ群より小さかったが有意差は見られなかった。結語：なんらかの心理因子が胃電図, 心電図のストレス反応性を修飾する可能性が想像された。

5. 体外式超音波と内圧測定を併用した近位胃適応弛緩の評価

広島大学医学部第一内科, 公立三次中央病院消化器科¹

原 陸展, 春間 賢, 楠 裕明, 眞部 紀明, 島谷 智彦, 井上 正規
島 二郎¹

【緒言】近位胃の適応弛緩能の評価にはバロスタットが用いられているが, より生理的条件下での評価法は確立されていない。最近体外式超音波 (以下 US) で近位胃の断面積を測定した報告が散見されるが内圧との関連は明らかではない。食物の胃内分布などを評価した報告は以前から散見される。【目的】US 法で近位胃の断面積を測定すると同時に経鼻胃管で胃内圧を測定し, 適応弛緩能の評価を試みた。【対象】健康男性 7 名 (清涼飲料 4 名, 流動食 3 例) で平均年齢は 34 歳であった。【方法】早朝空腹期に 2 種類の液体試験食 (清涼飲料: ポカリスエット, 流動食: カロリーメイト) を経鼻胃管から 5 分毎に 100 ml づつ投与し, US 法で左肋間走査で近位胃の断面積を測定した。同時に三方活栓で垂直方向に接続した水柱管によって胃内圧を計測した。【結果】投与量の増加に比例して近位胃の断面積は増加したが, 内圧は清涼飲料 $13.93 \pm 4.13 \text{ cmH}_2\text{O}$, 流動食 $10.41 \pm 0.81 \text{ cmH}_2\text{O}$ でほぼ一定であった。また清涼飲料 $1,050 \pm 65 \text{ ml}$, 流動食 $1,367 \pm 88 \text{ ml}$ 投与後で断面積の増加率は減少し, 内圧は清涼飲料 $1,150 \pm 50 \text{ ml}$, 流動食 $1,300 \pm 100 \text{ ml}$ で上昇した。清涼飲料と流動食の結果に明かな差は認めなかった。【結語】健康人の液体食負荷において, 1,000~1,300 ml までは等圧の近位胃弛緩反応が認められる。負荷量と US 上の断面積が linear な正の相関を示す領域では, 等圧な弛緩が行われている。

6. 高張食塩水 (マイルドイリタント) によるエタノール胃粘膜傷害抑制 (アダプティブサイトプロテクション) のメカニズム—胃粘膜微小血管の反応からの解析—

北里大学医学部薬理¹, 同内科², 伊勢原協同病院内科³

鎌田 一寿^{1,2}, 大野 隆^{2,3}, 佐伯 威男², 朴 勝春¹, 水口 澄人¹, 鹿取 信¹
西元寺克禮², 馬嶋 正隆¹

エタノール (EtOH) 胃粘膜傷害は細静脈 (集合細静脈を含む) の収縮による鬱血である。高張食塩水を予め投与するとプロスタグランジン (PGs; PGE_2 と PGI_2) が生成され, この後 EtOH を投与すると内因性 CGRP の遊離が起り EtOH 胃粘膜傷害は抑制される。その CGRP 遊離はインドメタシン (IDM) 前処置で消失することより PGs により EtOH 刺激で CGRP が遊離されると推察される。今回ラット胃粘膜微循環観察にてアダプティブサイトプロテクション (AC) における PGs (PGE_2 , PGI_2) と CGRP の関係を解析した。【方法】SD 系雄性ラットを 18-24 時間禁食し, ウレタン麻醉下に胃を大彎切開し後壁の粘膜面を下にして灌流槽に固定し Tyrode 液で灌流した。漿膜, 固有筋層, 粘膜下層の一部を切り取り観察窓を作製し, 透過光を用いて漿膜側より生体顕微鏡にて胃粘膜基底部微循環を観察し, 微小血管の径の変化を測定した。[薬物] PGE_2 , ベラプロスト (PGI_2 の誘導体); 0.001-10 μM , CGRP 8-37 (CGRP 拮抗薬; 10 μM) は観察窓に 20 μl 投与し, 1 M NaCl, EtOH (50%) は粘膜面に 1 ml 投与した。【結果】1) PGE_2 は用量依存的に細動脈を拡張させ細静脈を収縮させた。 PGI_2 は用量依存的に細動脈のみを拡張させた。2) AC は血流を変化させない PGs の用量で起こる為, その用量の PGE_2 , PGI_2 を投与し EtOH を投与すると鬱血の原因である細静脈の収縮はほぼ完全に抑制された。3) 1 M NaCl を前投与しておくとも EtOH による細静脈の収縮はほぼ完全に抑制された。4) CGRP 8-37 を予め投与しておき 1 M NaCl \rightarrow EtOH 又は $\text{PGI}_2 \rightarrow$ EtOH を投与すると細静脈は再び収縮した。5) CGRP 8-37 を予め投与しておき $\text{PGE}_2 \rightarrow$ EtOH を投与すると細静脈は収縮しなかった。【結論】AC は PGI_2 存在下に EtOH 刺激で CGRP が遊離され, その CGRP が EtOH による細静脈の収縮を抑制し胃粘膜傷害を抑制すると考えられた。

7. ^{13}C 呼気試験による胃排出能の検討 ～Caloric-feedback Regulationの視点から～

東海大学医学部消化器内科

財 裕明, 高安 博之, 三輪 剛

【目的】 ^{13}C オクタン酸で標識したクッキーを用い, caloric-feedback regulation の視点から, 呼気試験による胃排出能の検討を加えた。【対象・方法】40名の健常人が対象。被検者は100 mgの ^{13}C オクタン酸で標識したクッキー(総カロリー=200 kcal)を摂取後, 経時的に呼気を採取。Ghoosらの方程式を一部 modify し解析した。また caloric-feedback regulation を評価すべく, t lag時(%dose/hが上昇から下降に転じる)の呼気中 ^{13}C の積算値を, 上部小腸への caloric-loadの近似値として利用する事を考えつき, このパラメーター(Relative excreted % cumulative dose at t lag: Rt lag-CD(%))を加味し検討を行った。また10名の健常人に domperidone 10 mgを経口投与し, その影響を検討した。【結果】コントロール群の各パラメーターは, GEC (Gastric Emptying Coefficient) = 3.53 ± 1.09 (SD), t lag = 1.53 ± 0.68 h (SD), t 1/2 = 2.25 ± 0.77 h (SD)であった。また Rt lag-CDは, 変動係数が0.080と極めて小さく, 29.15 ± 2.35 % (SD)となった。domperidoneの投与は, 試験開始後, 少なくとも30分間は明らかな有意な差をもって%dose/hの値を上昇させたが, 対象によっては, 試験開始後の急激な%dose/hの上昇後, むしろ極端に低下する例が存在した。Rt lag-CDは, 25.04 ± 1.72 % (SD)で, 明らかな有意差をもって低下した。【考察・結論】胃排出は食物の上部小腸への流入により, 様々な feedback を受ける。我々の実験系では, 接種した ^{13}C の約29%が呼気中に排出された時点で, 胃排出のパターンが変化している。domperidoneは, この値を低下させたが, これは十分な caloric-feedback inhibition (ileal brake) の発生が, より少ない caloric-loadでも発生したことを意味する。%dose/hは, 単位時間あたりの上部小腸に対する caloric-loadを近似し, またその変化が, caloric-feedback regulation に重要な役割を果たしていると考えられる。

8. ^{13}C -octanoic acid breath test による逆流性食道炎患者の胃排出能の検討

東北大学医学部消化器病態学

北川 靖, 大原 秀一, 下瀬川 徹

【背景】これまでの胃排出能を測定する検査法は侵襲性, 簡便性などに問題があり, 必ずしも一般に広く行われてきたわけではない。近年 ^{13}C を用いた呼気試験による胃排出能測定法が開発され, その有用性について検討されてきている。逆流性食道炎患者において, 酸逆流の主因は食道運動機能異常とされているが, 胃排出遅延も影響を及ぼす因子の一つとして想定されている。しかしこれまで一定の見解は得られていない。【目的】 ^{13}C -octanoic acid breath test を用い, 逆流性食道炎患者の胃排出能について検討するとともに, 本試験法の有用性についても検討する。【方法】対象は内視鏡的に逆流性食道炎を認めた既往のある患者11人(男性7人, 女性4人, 平均年齢とし, 正常ボランティアと比較, 検討した。 ^{13}C -octanoic acid breath test は Ghoosらの方法に準じ, 試験食の総カロリーは250 kcalとした。検討パラメーターは lag phase (tlag), half-emptying time (t1/2), gastric emptying coefficient (GEC)を用いた。【結果】正常ボランティアと比較すると, 逆流性食道炎患者においては, tlag, t1/2は延長していたが, GECでは有意差はなかった。また明らかに胃排出能が遅延していると判断できる例が1例あった【結語】本試験法は逆流性食道炎の胃排出能を評価し, その病態を検討するのに有用となる可能性が考えられた。

9. ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査 (^{13}C 法) の位置づけと胃切除後の残胃排出能評価への応用についての検討

東京慈恵会医科大学外科

中田 浩二, 川崎 成郎, 羽生 信義, 梁井真一郎, 山本 尚, 向井 英晴
宮川 朗, 古川 良幸, 青木 照明

[目的] ^{13}C 呼気試験法胃排出能検査 (^{13}C 法) は, 簡便・安価で非侵襲的な胃排出能検査として注目され本邦でも急速に広まりつつある. しかし, ^{13}C 法における試験食, 測定方法, 評価指標などは報告者により異なり, RI 法との比較による胃排出能検査法としての位置づけについても明確にされていない. 今回われわれは, ^{13}C 法と RI 法を同一被験者に同時に行いその位置づけを明確にするとともに, ^{13}C 法を用いて胃癌胃切除後患者の残胃排出能を評価しその臨床的有用性について検討した. [方法] 健常人 6 名に ^{13}C -octanoic acid 100 mg と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA 40 MBq を卵黄に添加し加熱調理した目玉焼き 1ヶ, ロールパン 1ヶ, バター 4 g, コンソメスープ 160 ml (約 230 kcal) からなる固形試験食を摂取させ, 食後 6 時間まで 15 分毎に呼気の採取とガンマカメラによる撮影を行った. RI 法と ^{13}C 法における胃排出能の各評価指標を比較し, それぞれの相関性について検討した. また, 術後 6 ヶ月以上経過した胃癌幽門側胃切除 + Billroth I 法再建術後患者 4 名に ^{13}C 法による胃排出能検査を行い健常人と比較検討した. [結果] ^{13}C 法の Tmax, T1/2 と RI 法と T1/2, 胃排出曲線の摂取後 120 分値から 240 分値, の間に相関係数 0.8 以上と高い相関が認められた. 胃切除後患者では健常人と比較して Tmax, Lag time, T1/2, 摂取後 15 分から 165 分の胃内残存率において有意な胃排出亢進が認められた. [結論] ^{13}C 法は間接法であるがデータ処理を行なうことにより定量的な胃排出能評価が可能であった. Tmax は複雑な計算を必要とせず検査時間の短縮 (4 時間) が可能であることから定性的な胃排出能評価の指標として有用であった. コンピュータプログラムにより求めた Lag time, T1/2, 各時点の胃内残存率を用いることにより, より詳細で定量的な胃排出動態の評価が可能であった. ^{13}C 法を胃切除後患者に行うことにより残胃排出能の評価が可能であり, 術後 QOL を評価する上で臨床的に有用と考えられた.

10. 胃切除後の食道痙攣を伴う噴門通過障害の 1 症例

日本大学医学部外科学講座外科 3 部門

田中 和彦, 佐藤 博信, 村山 公, 宋 圭男, 大塚 善久, 深瀬 知之
橋爪 正明, 小林 秀昭, 稲見 直邦, 高山 忠利

はじめに: 食道痙攣を伴う噴門通過障害の 1 症例を経験したので, 食道機能検査, 特に食道内圧測定に関する考察を含めて報告する.

症例: 88 歳の男性. 2 年前, 嚥下困難を主訴に発症し, 2000 年 10 月近医を受診した. 食道透視にて食道アカラシアの診断をもとに食道ブジー施行したが改善しないため同年 12 月精査加療目的にて当科紹介受診した.

既往歴: 30 歳時胃潰瘍にて広範囲胃切除術 (Billroth II 法) 施行. 甲状腺機能低下症.

所見: 食道透視では胸部中部から下部食道にかけての食道痙攣, バリウムの噴門部通過障害を認めた. 臭化ブチルスコポラミン静脈注射にて若干の改善を認めるが十分な効果は認められなかった. 内視鏡では噴門部は開き, 食道より胃内が観察可能であった. 食道内圧測定上では LESF の上昇を認め, 嚥下波も同期性パターンで, 同期性収縮波も認められた. 飲水負荷試験では静止圧の回復時間の遅延が認められた.

経過: 2001 年 3 月入院したが, 高齢のうえに誤嚥に伴う肺炎の合併も認められたため手術治療を断念した. 臭化ブチルスコポラミン, Ca 拮抗剤, マイナートランキライザー経口投与にて症状の改善が認められたため, 同年 4 月軽快退院した.

考察: 食道透視, 内視鏡所見はともに相反する結果が得られた. 食道内圧測定, 食道透視上では食道痙攣を伴う食道アカラシアを思わせる所見が認められたが内視鏡では通過障害を示唆する所見は認められなかった. 本症例は食道痙攣を伴う噴門通過障害ではあるが, 食道アカラシアとも, 食道痙攣とも明確に分類できず, 鑑別に難渋した 1 例であった.

11. 胃切後の再建術式に関する腸管運動生理学的観点からの研究

山梨医科大学第2外科

高野 邦夫, 毛利 成昭, 荒井 洋志, 大矢 知昇, 腰塚 浩三, 多田 祐輔

【研究の目的】 胃切除後の再建術式は、ながらく Billroth 法が行われてきたが、近年術後の消化液の胃内及び食道への逆流による種々の症状や障害、残胃癌の発生が臨床的に問題となってきた。

そこで、我々は消化管運動生理の観点から、逆流による障害を減じ、発癌の危険がないような再建方法を明らかにするため研究を進め興味ある知見を得た。研究結果を報告するとともに、胃切除後の術式に関して我々の考えを述べたい。

【対象と方法】 雑種成犬を用いて以下の3群に分けた。コントロールを1群とし、銀針双極電極を十二指腸および空腸5カ所に逢着した。2群と3群はそれぞれ全身麻酔下に空腸間置またはR-Y法による再建を行い、術後約1年に再開腹して1群と同様に銀針双極電極を逢着した。全群犬が健康を回復してから意識下に腸管運動を導出記録し、得に腸管の協調運動を筋電図学的にBER放電頻度、Migrating myoelectric complex (MMC)の発生間隔・持続時間・伝播様式などを分析検討した。

【結果】 空腸間置による再建術では間置空腸から十二指腸への伝播が協調しないため、間置空腸や胃に腸内容が停滞することが推測されたが、R-Y法ではMMCがY脚を口側から肛門側へと伝播し、口側空腸との良好な協調運動を認めた。

【結語】 胃切後の消化液の逆流のメカニズムとしては、消化管の協調運動の障害によることが示唆された。また、消化液が胃内に逆流しにくい術式を選択するにあたっては、R-Y法が実験的にも臨床的にも、優れた再建術式として、今後積極的に用いられてよいと考えられた。

12. ラット腸間膜動脈内皮除去標本における血管弛緩反応の増強

岡山大学大学院自然科学研究科臨床薬学

川崎 博己, 磯部佐知子, 黒崎 勇二

【目的】 血管内皮細胞は単なる血管壁のバリアーとしての役割を持つだけでなく、様々な血管内皮由来物質を遊離することによって血管緊張度を調節していると考えられている。血管収縮物質による血管収縮反応は内皮除去により著明に増強することは知られているが、血管弛緩反応に対する内皮除去の影響は未だ不明な点が多い。我々は、血管拡張性神経の経壁電気刺激による血管弛緩反応が内皮除去により増強することを報告した。今回、各種血管弛緩物質、すなわち β 受容体作動薬 isoproterenol, NO 供与体 sodium nitroprusside (SNP), カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP), 経壁電気刺激 (PNS) の血管弛緩反応に対する内皮除去の影響、およびその機序について検討した。【方法】 実験はラット腸間膜動脈血管床の灌流標本を用い、灌流圧の変化を抵抗血管の緊張度変化として測定した。内皮細胞除去は sodium deoxycholate を 30 秒間灌流することで行った。【結果】 guanethidine (5 μ M) 存在下に methoxamine (7 μ M) で血管収縮を起こした正常内皮保持標本において、acetylcholine (ACh 0.5 nmol) 注入では一過性の血管弛緩反応が出現した。また isoproterenol (10^{-9} - 10^{-6} M), SNP (10^{-9} - 10^{-6} M), CGRP (10^{-10} - 10^{-8} M) の 5 分間の灌流によって濃度依存的な持続性の血管弛緩反応が出現し、PNS (0.5-2 Hz) では刺激頻度依存的な血管弛緩反応が出現した。内皮細胞除去標本では、ACh の反応は消失したが、isoproterenol, SNP, CGRP, PNS による血管弛緩反応は増強し、反応の持続も延長した。また、indomethacin (0.5 μ M) の灌流により各血管弛緩反応は増強する傾向が見られた。【考察】 以上の結果、血管内皮細胞は血管収縮の調節ばかりでなく、血管弛緩も抑制的に調節することにより、血管緊張度をコントロールしていることが示唆される。

13. ラット腸間膜動脈抵抗血管におけるアセチルコリンおよびニコチンによるニコチン受容体を介する内皮非依存性血管拡張反応

岡山大学大学院自然科学研究科臨床薬学

手塚 智子, 黒崎 勇二, 川崎 博己

【目的】我々はラット腸間膜動脈には非アドレナリン性非コリン性の血管拡張性神経である Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) 作動性神経が分布し, 交感神経とともに血管の緊張度に関与していることを明らかにしている. また内皮除去標本においてアセチルコリン (ACh) が CGRP 神経上のムスカリン受容体を介し, またニコチンが交感神経上のニコチン受容体と CGRP 作動性神経を介して内皮非依存性血管拡張反応を起こすことを報告している. 今回 ACh およびニコチンによる, ニコチン受容体を介する血管拡張反応について検討した. 【方法】摘出ラット腸間膜動脈血管床の灌流標本を作製し, Krebs 液を一定流量で灌流し, 灌流圧変化を血管緊張度変化として測定した. 【結果】内皮除去標本において ACh 10^{-6} ~ 10^{-4} M の灌流により起こる濃度依存性血管拡張反応は冷所保存による除神経処置により消失した. また atropine 存在下において, ニコチン受容体遮断薬 (hexamethonium), 交感神経遮断薬 (guanethidine, bretylium), 交感神経破壊薬 (6-hydroxydopamine), CGRP 作動性神経毒 capsaicin 前処理および CGRP 受容体遮断薬 CGRP[8-37] によってさらに抑制された. ニコチンの血管拡張反応も hexamethonium, guanethidine, bretylium, 6-hydroxydopamine, capsaicin, CGRP[8-37] によって抑制されたが NMDA 受容体遮断薬 CPP, L-DOPA 受容体拮抗薬 L-DOPA CHE, ドパミン D1 受容体拮抗薬 SCH23390, ドパミン D2 受容体拮抗薬 haloperidol, ATP P2X 受容体脱感作薬 α , β -methylene ATP では抑制されなかった. 【考察】ACh およびニコチンは交感神経上のニコチン受容体に作用しさらに CGRP 作動性神経を介して CGRP を遊離し血管拡張反応を起こすことが示唆された. この反応において, glutamate, L-DOPA, dopamine, ATP の関与は少ないと考えられる.

14. ラット門脈輪状筋における L-アルギニンによる収縮について

北海道医療大学薬学部臨床薬理毒理学, 近畿大学ライフサイエンス研究所¹,
同薬学部機能形態学²

島村 佳一, 木村 真一, 山本 和夫¹, 関口富美子², 砂野 哲²

ラット門脈輪状筋の収縮調節における一酸化窒素の役割について検討してきたが, その際 L-アルギニンが, しばしば収縮を発生させたので本研究では, L-アルギニンの作用について再検討した. 麻酔した Wistar ラットから門脈を摘出し, 輪状筋方向の標本を作成した. 等尺性収縮力をタイロード液中で記録した. また微小電極法で輪状筋の膜電位を記録した.

すでに報告したように, 内皮正常標本で L-ニトロアルギニン 10^{-4} M は細胞外 Ca 依存性の緊張性収縮を発生させ, さらに L-アルギニン 10^{-3} M を加えると弛緩したが, 弛緩は一過性収縮を伴った. 膜電位記録においても L-ニトロアルギニン 10^{-4} M による活動電位数の増加は L-アルギニン 10^{-3} M を加えると減少したが, このとき減少の前に一過性増加がみられた. L-アルギニン 10^{-3} M 単独投与においても一過性収縮を発生した.

以上よりラット門脈輪状筋における L-アルギニンの収縮作用には活動電位の増加が関与すると考えられる.

15. 糖尿病ラットの胸部大動脈における内皮依存性弛緩反応の減弱とエンドセリン-1の関与

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態学

蟹江 典靖, 鎌田 勝雄

近年様々な病態時において ET-1 の関与が示唆され, 糖尿病時での ET-1 の関与も多数報告されている。当研究室においても以前より糖尿病時における ET-1 の関与を報告してきた。そこで今回, ET-1 の内皮依存性弛緩反応の関与を検討するために, 新規 ET-1 受容体拮抗薬である J-104132 (ET_A/ET_B receptor antagonist Banyu Co.: 10 mg/kg) を糖尿病ラットに 4 週間経口投与し, 胸部大動脈における収縮反応, 弛緩反応の変化について検討した。

糖尿病動物は STZ 75 mg/kg を尾側静脈内投与することにより作成し, 投与後 11 週経過したものを使用した。摘出した胸部大動脈を長さ 20 mm 幅 2 mm のらせん標本を作製した。標本は, Krebs-Henseleit 液を含む organ bath 中に懸垂し 1.0 g の静止張力をかけ, 反応は等尺性に記録し, NE, ET-1 による収縮反応 ACh, SNP による弛緩反応を検討した。

J-104132 を慢性投与しても NE, ET-1 や SNP による収縮反応, 弛緩反応は変化が見られなかったが, ACh による内皮依存性弛緩反応は糖尿病群に対し有意に改善され, またコントロール群と同レベルまで改善されていた。また, RT-PCR により eNOS mRNA 発現量の定量を行ったところ, 変化は見られなかった。

以上のことから糖尿病時における内皮依存性弛緩反応の減弱は, ET-1 が一因していることが示唆された。

16. 妊娠中毒症抵抗血管における内皮由来過分極因子に関する検討

名古屋市立大学医学部産科婦人科, 同薬理¹

鈴木 佳克, 山本 珠生, 鈴森 薫, 服部 友紀¹, 梶栗 潤子¹, 伊藤 猛雄¹

【目的】妊娠中毒症(中毒症)は末梢血管抵抗の増大による血圧の上昇, 血管透過性の亢進による全身浮腫や血液凝固障害などを主徴とする重篤な妊娠異常である。我々はその病態解明のために中毒症血管の特性に関する研究を進めて来た結果, これまでに中毒症抵抗血管において内皮由来弛緩因子の一つである nitric oxide (NO) による血管平滑筋弛緩反応に異常を認めるとの結論を得た。内皮由来過分極因子(EDHF)は NO よりさらに細い動脈での循環に重要な役割を果たすとされているが, 中毒症における特性は明らかではない。【方法】対象は純粋型中毒症 15 名と正常血圧妊婦 25 名とした。同意の得られた患者より帝王切開時に, 大網を摘出, 直径 0.1-0.3 mm の動脈を分離し, 標本を作成した。ジクロフェナック(シクロオキシゲナーゼ阻害薬)と L-ニトロアルギニン(NO 阻害薬)存在下で, 内皮温存標本を用いて等尺性張力測定法によりトロンボキサン A₂ 類似薬(STA₂)収縮に対する EDHF の反応性について検討した。内皮除去標本にて K チャネル開口薬の反応性を検討した。また, 内皮温存標本を用いて微小電極法により平滑筋細胞の膜電位も測定した。【成績】ブラジキニン(BK)により中毒症と正常血圧妊婦において同程度の STA₂ 収縮抑制が認められた。その抑制はカリプトトキシン(ChTX)とアパミン(apa)の存在にて消失した。また, BK により細胞膜が過分極し, それも ChTX と apa により消失した。内皮除去標本において I-EBIO (Ca²⁺ activated K チャネル開口薬)により STA₂ 収縮は濃度依存性に抑制され, それは中毒症と正常血圧妊婦で差を認めなかった。【結論】EDHF による内皮由来弛緩反応は中毒症の抵抗血管において, NO とは異なり温存されている可能性が示唆された。

17. エストロゲンによる内皮由来過分極因子反応及びにコネキシン 43 発現の変化に関する検討

北海道大学大学院医学研究科循環病態内科, 同細胞薬理¹

縄手 聡, 深尾 充宏¹, 佐久間一郎, 三輪 聡¹

【目的】 エストロゲンは内皮由来弛緩因子である NO・PGI₂ の産生を亢進することが報告されているが, 第 3 の弛緩因子である内皮由来過分極因子 (EDHF) に対する影響は不明である。現時点で EDHF の本態は不明であるものの, 血管内皮—平滑筋間のギャップジャンクションが EDHF 反応に関与していることが報告されている。本研究では, エストロゲンの EDHF 反応への影響及びギャップジャンクション蛋白であるコネキシン 43 (Cx43) の発現に対する影響について検討した。

【方法】 40 週齢の雌性 Wistar ラットを以下の 3 群に分類した。(1) コントロール群 (CONT), (2) 卵巣摘出群 (OVX), (3) 卵巣摘出後エストロゲン補充群 (OVX+ER)。4 週後に上腸間膜動脈を摘出し, (A) 等尺性張力測定, (B) 微小電極による膜電位の測定, (C) 抗 Cx43 抗体による免疫染色, (D) 抗 Cx43 抗体によるウエスタンブロットティングにより検討した。

【結果】 EDHF による血管弛緩反応及び膜電位過分極反応は OVX 群において有意に低下していたが, エストロゲン投与により回復した (アセチルコリン 1 μ M による過分極反応, CON: 12.5 \pm 1.5 mV, OVX: 2.5 \pm 0.5 mV, OVX+ER: 8.1 \pm 0.7 mV)。EDHF による血管弛緩反応はギャップ結合阻害薬の 18 β グリチルレチン酸により抑制された。免疫染色, ウエスタンブロットティングにおいて Cx43 の発現は OVX 群で減少し, ER 群で回復した。

【総括】 エストロゲンは EDHF 反応の維持に重要な役割を果たしており, その機序の一つとして Cx43 の発現量の調節が考えられた。

18. 消化管運動ペースメーカー細胞のカルシウム動態—組織小片を用いた解析—

名古屋大学大学院医学研究科機能形態学講座分子細胞学, 同細胞科学講座細胞生理¹

鳥橋 茂子, 中山 晋介¹

緒言: 我々はこれまで消化管運動のペースメーカー細胞が癌原遺伝子 *c-kit* を発現し, 従来形態学的にカハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal; ICC) と言われてきた細胞に相当する事を明らかにしてきた。近年, 細胞内ストアからのカルシウム放出がペースメーカー機構に関わる事が報告され ICC のカルシウム動態が注目されている。我々は単離された ICC が必ずしも vivo での生理状態を反映するとは限らないと考え, 細胞レベルと組織の中間の実験系を作ってペースメーカー機構に関わるカルシウム動態を調べた。方法: 生後 10-14 日齢マウス小腸の筋層を剥離し, 細切と酵素処理により組織小片 (直径約 100-150 μ m) を作った。24-48 h 培養の後 Fluo3AM を添加して ARGUS HiSCA により組織小片のカルシウム濃度変化を記録した。組織外液は 35°C で灌流し, nifedipine (1-5 μ M), CdCl₂ (1 μ M), SK & F (4-40 μ M) を要時添加した。抗 *c-Kit* 抗体 (ACK2), 抗 TRP-4, TRP-6 抗体による免疫組織化学を行った。結果: 組織小片は生体とほぼ同じ頻度でカルシウム変動を伴う収縮運動をした。これらは nifedipine でブロックされたが組織片中の *c-Kit* 陽性細胞分布域では同じ周期でカルシウム変動が継続した。nifedipine 存在下で外液のカルシウムを取り除くと *c-Kit* 陽性細胞存在部位のカルシウム変動は消失した。さらに Cd²⁺, SK & F もカルシウム変動を抑制し, 消失させた。免疫組織化学的に TRP-4 の免疫活性が *c-Kit* 陽性細胞に証明された。結論: *c-Kit* 陽性細胞 (ICC) のカルシウム変動はペースメーカー機構に密接に関連し細胞外からのカルシウムの取り込みを必要とするが, これは L-type calcium channel 以外の機構による。また ICC に TRP-4 の免疫活性が示された事から nonselective cation channel, receptor-operated calcium channel としての特性を示す TRP-4 が ICC のペースメーカー機構に関わる可能性が強く示唆された。

19. 胃腸管において Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel の SK3 はカハールの介在細胞に特異的に発現する

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻応用薬理, 堺市民病院病理・研究科¹

藤田 秋一, 竹内 正吉, 西東 規子, 花井 淳¹, 畑 文明

現在までに Small conductance Ca^{2+} -activated K^+ (SK) channel は 4 つのサブタイプがクローニングされている。このうち SK channel の特異的遮断薬である apamin は SK1, SK2, SK3 を遮断し, また apamin は摘出腸管の運動性に影響することが報告されている。そこで本研究では腸管にどのサブタイプの SK channel が発現し, そしてどの細胞に局在するかを検討した。RT-PCR 解析によりラット腸管には SK1 と SK2 の発現は少なく, SK3 および SK4 が多く発現していることがわかった。そして, 免疫組織学的手法により抗 SK3 抗体の免疫反応部位は胃と腸の両方において, アウエルバッハの神経叢と平滑筋細胞間の神経叢に認められた。またこの SK3 陽性細胞はグリアおよび神経細胞のマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) および neurofilament の抗体では染色されなかった。免疫電子顕微鏡的手法によりこの SK3 陽性細胞はカハールの介在細胞であることがわかった。カハールの介在細胞は胃腸管でのペースメーカー細胞であることがわかっていて, このことから SK3 channel はカハールの介在細胞においてペースメーカー電流の発生に寄与することが考えられる。

20. マウス近側結腸における粘膜下歩調取り細胞の電気活動

名古屋市立大学医学部第一生理¹, 奈良県立医科大学第二生理²

米田 諭^{1,2}, 高野 博充¹, 門脇 真², 高木 都², 鈴木 光¹

マウス近側結腸の平滑筋組織における自発活動発生の細胞内機序を, 微小電極を用いて記録した膜電位の変化を指標にして調べ, 3 つの型の自発活動が記録できた。記録された細胞の局在を neurobiotin 注入により確認したところ, 粘膜下層に分布する直径 20~30 μ の卵円形の細胞で両側に 50 μ m の突起を有する細胞からは振幅約 20 mV で頻度約 15 回/分のプラトー相を持つ緩電位 (持続, 約 2.6 秒) が記録され, 歩調取り電位と考えた。輪走ならびに縦走平滑筋は群発活動電位を律動的に毎分 4-5 回ほど発生しており, 電気活動は粘膜下細胞と波形も異なり, また同期していなかった。Nifedipine 0.1 μ M は平滑筋の電気活動を抑制し, 歩調取り電位の持続を短くしたが, 振幅と頻度は変えなかった。Nifedipine 1 μ M は歩調取り電位を消失させた。歩調取り電位は 2-APB (IP₃ 受容体抑制) や ryanodine で消失した。CPA や caffeine により細胞内の貯蔵 Ca^{2+} を枯渇させたり, BAPTA により細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させると歩調取り電位は消失し, あるいは著明に抑制された。CCCP (ミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みを阻害) は歩調取り電位の発生を抑制した。これらの結果から, 結腸粘膜下層で発生する歩調取り電位は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルから流入する Ca^{2+} がその引き金や電位持続に関与しており, さらに細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出およびミトコンドリアへの Ca^{2+} 取り込みなども関連していると考えられた。また, 粘膜下層歩調取り細胞の活動は平滑筋の活動とは連動していないことがわかった。

21. モルモット胃幽門部 ICC 細胞（カハールの間質細胞）の自発活動の性質

名古屋市立大学医学部第一生理

鬼頭 佳彦, 福田 裕康, 鈴木 光

モルモット胃幽門部 ICC 細胞の自発活動の性質について細胞内電位を指標にして調べた。caffeine (1 mM) は Driving Potential の頻度を低下させ、3 mM まで濃度を上げると持続時間を短くし頻度をさらに低下させた。CPA (10 μ M) は膜を脱分極させ、Driving Potential の持続時間を短くし頻度を増加させた。CPA と SKF96365 (30 μ M) の同時投与により、膜は脱分極し、Driving Potential の持続時間は短くなり、一過性に頻度が増加した後自発活動は消失した。外液の Ca 濃度を減少させると、Driving Potential の持続時間が短くなり頻度が低下した。BAPTA-AM (50 μ M) は Driving Potential の持続時間を短くし頻度を低下させた後、自発活動を消失させた。CCCP (ミトコンドリアのプロトノフォア) は膜を脱分極させ、自発活動を消失させた。以上のことより、モルモット胃幽門部 ICC 細胞の自発活動の発生には、細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca の遊離とミトコンドリアへの Ca の uptake が関与している可能性が示唆された。

22. マウス小腸平滑筋の自発的電気活動と自動運動

奈良県立医科大学第一外科, 同第二生理¹

中川 正, 山内 昌哉, 杉森 志穂, 上島 成幸¹, 藤井 久男, 高木 都¹

【はじめに】消化管平滑筋の自動運動は、slow wave (SW) と呼ばれるペースメーカー電位によってその収縮頻度を調節されている。さらにこの SW はカハールの間質細胞 (ICC) から発生していると云われている。今回、本研究において、マウス小腸の電気的活動と自動運動を同時に記録し、消化管の自動運動を制御する機構について検討した。【動物】マウス；Myenteric region の ICC (ICC-MY) を欠く変異種 W/W^v (Huizinga ら, 1995) と +/+ をコントロールとして用いた。さらに、Balb/C も用いて比較した。【方法】空腸起始部あるいは回腸末端から採取したそれぞれ 1 cm の長さの腸管を標本とした。口側端に Force transducer を装着し、肛門側端は Pressure transducer に連結する細管に固定した。同時に漿膜面に吸引電極を装着し電気活動を記録した。【結果】Balb/C および +/+ : SW の周期は空腸で 48.4 ± 2.9 cpm (n=7), 回腸で 40.8 ± 1.0 cpm (n=5) であった。縦走筋方向の運動 (L) は、SW に同期し一定の振幅を示す。輪走筋の収縮を反映する圧波形 (C) は SW に重畳する action potentials (AP) の群発と一致して起こる傾向にあった。Tetrodotoxin (TTX) の投与により AP の発生は充進し、C は規則性が增大した。Nifedipine 1 μ M 投与により運動を消失させると、空腸では SW が消失したが、末端部回腸では SW は振幅と周期は減少した (26.3 ± 3.1 cpm, n=6) が、明らかに残存した。W/W^v : SW は記録できなかったが、不規則に群発する AP に同期して運動 L と C が発現した。この AP の群発と同期して C が起こる傾向はコントロールと同様であった。TTX の投与により AP, L, C の規則性が增大した。【考察】消化管自動運動の制御に ICC のペースメーカー機能とやらんで神経性調節も重要であり、ICC の機能が損なわれた状態においては神経性調節の重要性が増大している可能性がある。

23. モルモット膀胱単離平滑筋細胞を用いた脱分極時のミトコンドリア Ca^{2+} 画像解析

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学

山村 寿男, 坂本 多穂, 村木 克彦, 今泉 祐治

ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込み機能は、虚血や代謝障害などの細胞内 Ca^{2+} 過負荷状態を緩衝するためにのみ作動すると考えられてきた。しかし、ミトコンドリアが局所 Ca^{2+} 動態を制御する小胞体の一部と空間・構造的に極めて近接していることが報告されたため、正常時における細胞内 Ca^{2+} 動態の恒常性保持にもミトコンドリアは寄与している可能性が高い。そこで本研究では、生理的条件下でのミトコンドリア Ca^{2+} 貯蔵機能が細胞内 Ca^{2+} 動態に果たす役割について検討した。酵素処理により得たモルモット膀胱単離平滑筋細胞を用いて、高速走査型共焦点蛍光顕微鏡 (Nikon RCM-8000) とホールセルパッチクランプ法により二次元 Ca^{2+} 蛍光画像と細胞膜電流を同時に測定した。ミトコンドリア Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_m$) と細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) の蛍光指示薬として、 $3 \mu\text{M}$ Rhod-2 と $30 \mu\text{M}$ Fluo-4 を使用した。その結果、保持電位 -60 mV から 0 mV への 50 ms の脱分極刺激による細胞外からの Ca^{2+} 流入によって惹起された $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 増加に引き続いて $[\text{Ca}^{2+}]_m$ も上昇した。この際、局所的な $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 増加部位 (Ca^{2+} ホットスポット) 近傍における $[\text{Ca}^{2+}]_m$ 上昇の程度は、それ以外の部位と比較して大きかった。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_m$ の上昇・回復時間は、 $[\text{Ca}^{2+}]_c$ のそれらと比較して有意に長かった。これらの結果は、ミトコンドリアによる Ca^{2+} 取り込み機能が、様々な刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_c$ 増加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の旧復機構の一端を担って機能し、さらに局所 Ca^{2+} 遊離を起こす筋小胞体に近接しているミトコンドリアでは、 Ca^{2+} 取り込み機能が他の部位のそれよりも高いレベルで作動している可能性がある。以上より、ミトコンドリアは正常時においても Ca^{2+} 取り込み機能を発揮し、特に、局所ミトコンドリアが活動電位発生などの生理的 Ca^{2+} 上昇の後の局所 Ca^{2+} 取り込みに寄与していることを示唆している。

24. ラット腎盂尿管標本における平滑筋細胞 Ca^{2+} 動態の観察

日本大学医学部先進医学総合研究センター¹, 日本大学医学部生理²,
東京医科大学生理第一³, 名古屋大学大学院医学専攻細胞生理⁴

山下 俊一^{1,2}, 國分眞一郎^{1,2}, 小西 真人³, 中山 晋介⁴

10 週齢雄性ラットより摘出した腎盂尿管標本に fluo3-AM をロードし ($20 \mu\text{M}$, 8 時間), 共焦点顕微鏡 (Leica TCS-NT) により組織のまま細胞内 Ca^{2+} 動態を観察した。腎盂尿管移行部より下流では網目状構造を作る平滑筋束を認めた。この平滑筋束では周期的に発生する自発性蠕動運動に伴って下流に向かって伝播する Ca^{2+} 濃度上昇が発生した。Wortmannin $5 \mu\text{M}$ により蠕動運動を抑制し, line scan により測定した伝播速度は $1.8 \mu\text{m}/\text{ms}$ であった。この発生は nifedipine $10 \mu\text{M}$, および heptanol 3 mM により完全に消失することから, 腎盂ペースメーカー部位からの興奮伝導に伴う, L-type Ca^{2+} チャンネルを介した外液 Ca^{2+} 流入によると考えられる。一方, 高倍率で観察することにより, 興奮伝導に伴う Ca^{2+} 濃度上昇の合間に, 個々の尿管平滑筋細胞内で発生し, 消退することなく細胞内を伝播する Ca^{2+} 濃度上昇が観察された。伝播速度は前述のものより著しく遅い ($0.04 \mu\text{m}/\text{ms}$) が, 発生部位よりもより離れた位置で蛍光強度の立ち上がり急峻になり, ピーク値も高くなることから拡散によるものではない。この Ca^{2+} 濃度上昇は nifedipine や heptanol 存在下では持続するが, xestospongin C 存在下では消失することから, 細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出により惹起される Calcium wave であろうと考えられる。

25. 平滑筋臓器におけるリアノジン感受性カルシウム放出の特性と臓器依存性

熊本大学医学部薬理第二

徳富 直史, 徳富 芳子, 西 勝英

骨格筋や心筋と異なり, 平滑筋におけるリアノジン感受性カルシウム放出の役割は, 臓器の収縮特性に対応して多様である。我々はマウス胃および膀胱平滑筋におけるリアノジン受容体応答の特性について, ニスタチン穿孔パッチクランプ法による膜電流, fura2 による細胞内カルシウム濃度, および等尺性収縮張力を用いて検討したので報告する。実験には生後3週目の雄性 BALB/c マウスを用いた。

胃および膀胱の単離平滑筋細胞は膜電位固定下, カフェイン (0.3~10 mM) 投与に対して大コンダクタンス型 (BK 型) カルシウム活性化 K 電流 (CAF 電流) を発生し, またカルシウム濃度測定では 200 nM 付近の静止レベルから 400~700 nM への一過性上昇を示した。両平滑筋臓器由来の CAF 電流とカルシウム上昇は L 型カルシウムチャネル活性に依存し, リアノジンに対して強い感受性を示した。胃切片の収縮測定ではカフェイン投与により, 低濃度 (0.1~1 mM) で弛緩反応, 高濃度 (≥ 3 mM) で一過性の収縮につづく強力な弛緩反応が見られたが, 膀胱ではカフェイン単独で無反応, カルバコールで収縮させた切片で弛緩反応のみが見られた。高濃度カフェインで惹起された胃切片の収縮-弛緩複合反応のうち, 弛緩相のみが他の収縮刺激 (高カリウムおよびカルバコール) 存在下, 有意に加速された。以上より, マウス胃および膀胱平滑筋におけるリアノジン感受性カルシウム放出は, 臓器間で共通した特性として L 型カルシウムチャネルおよび BK チャネルと共同して膜電位と細胞内カルシウムレベルの調節に関与していることが示唆された。一方, 収縮エレメントにおける同カルシウム放出の役割は平滑筋臓器の収縮特性に対応して多様であり, おそらく他のカルシウム依存性分子を伴って分化したものと考えられる。

26. Type 2 リアノジン受容体と FKBP との相互作用

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

糸永 康洋, 尾上 均, 伊東 祐之

[目的] 脊椎動物の骨格筋型細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルである type 1 リアノジン受容体 (RYR1) には, チャネル 1 分子に対して 4 分子の 12 kD FK506 結合蛋白質 (FKBP12) が結合してチャネル活性を調節している。一方心筋型の type 2 RYR (RYR2) には FKBP12 ではなく FKBP12.6 が特異的に結合すると考えられている。RYR2 は心筋以外でも平滑筋をはじめとする種々の細胞に発現しているが, FKBP12.6 が RYR2 に特異的に結合していることが明確に示されているのはイヌ心筋においてのみであり, また FKBP12.6 が RYR2 と結合していることの機能的意義は現在のところ不明である。今回イヌ以外の哺乳類において RYR2 が FKBP12.6 に対して結合選択性を持つかどうかを検討した。

[結果] 種々の哺乳類の心筋 SR (CSR) 分画に対して Western blot 解析を行ったところ, プタ, ラット, マウスにおいてはイヌ同様に FKBP12.6 が, ウサギにおいては FKBP12 が検出された。FK506 で前処理して, RYR2 に結合している内因性 FKBBP を除去した CSR を, $1 \mu M$ の recombinant FKBP12 あるいは FKBP12.6 と incubate したのち Western blot 解析を行うと, いずれの CSR からでも FKBP12.6 は検出されたが FKBP12 は検出されなかった。上記の FKBP12.6 を再結合させた CSR から RYR2 を免疫沈降すると FKBP12.6 の共沈が見られた。[3H] リアノジン結合に対する [3H] FK506 結合の量比はイヌ, プタ CSR で約 4, ラット, マウス, ウサギ CSR では 2.5 以下であった。

[結論] イヌ以外の哺乳類の RYR2 も FKBP12 に比べて FKBP12.6 に対して高い結合親和性を持つと考えられた。ウサギ CSR が FKBP12 を含んでいることおよびマウス, ラット, ウサギ CSR における [3H] リアノジン結合に対する [3H] FK506 結合の量比が 4 を下回っていたことから, これらの動物では結合親和性の差が小さいことが考えられた。

27. 核磁気共鳴法による平滑筋細胞内遊離 Mg 濃度測定の新しい解離定数算出法の導入

名古屋大学大学院医学研究科老年科, 同細胞生理¹, Oxford 大学薬理²

野村 秀樹, Lorraine M. Smith², 中山 晋介¹

Mg は多くの細胞内酵素の活性やイオンチャネルなどの重要な生体機構に関与することが知られている。もし平滑筋において, Mg イオンが受動的なトランスポーターのみで運ばれていれば, 電気化学平衡によって $[Mg]_i$ は 100 mM を超える濃度となる。私たちは, 核磁気共鳴法を用いて, 平滑筋の細胞内遊離 Mg 濃度 ($[Mg]_i$) を測定した結果, 正常状態での $[Mg]_i$ はサブミリモル (0.3-0.4 mM) の範囲に保たれていることを報告した。またこのように $[Mg]_i$ が低く保たれているのは, 細胞膜内外の Na 濃度勾配に依存した Mg のくみ出し (Na-Mg 交換) によることを明らかにしてきた (Nakayama, Nomura & Tomita, *J. Gen Physiol.* 103, 833-851, 1994; Nakayama & Nomura, *J. Physiol.* 488, 1-12, 1995)。一方, Ca によって阻害される受動的な Mg イオン流入経路の存在も示唆した。

私たちの核磁気共鳴法による測定では, 平滑筋標本において観察される ATP ピークの共鳴周波数から遊離 ATP の比率をもとめ, そこへ Mg と ATP の解離定数を仮定することによって, $[Mg]_i$ を計算した。これまで, pH による MgATP の解離定数の補正は, Bock et al. (Bock, Wenz & Gupta, *Blood* 65, 1526-1530, 1985) の方法を用いて行ってきた。その後, Zhang et al. (Zhang, Truttman, Luthi & McGuigan, *Anal. Biochem.* 251, 246-250, 1997) は, Mg 電極によるモデル液の計測をもとに, 基礎となる MgATP の解離定数をこれまでのものの約 2 倍とし, そして異なる pH 補正法も示した。

本研究では, 私たちのこれまでの遊離 ATP 測定 (β -, γ -ATP による遊離 ATP と pH の同時測定含む) に Zhang et al. (1997) の解離定数に関する取り扱いを導入して, $[Mg]_i$ 変動の再検討を行った。また, Mg-free, Ca-free 溶液中における細胞内 Mg の減少が, 細胞外イオン置換物によって影響されることも, この方法を用いて併せて検討した。

28. 平滑筋性 ATP 放出に関与する IP3 と ryanodine 系の異なるシグナル経路

福岡大学医学部薬理, 同病態機能系総研¹

桂木 猛, 藤木 園, 佐藤千江美¹, 上野 伸哉

先に受容体刺激による平滑筋細胞からの ATP 放出機構について検討を行い, モルモット回腸縦走筋からの ATP 放出には IP3 系が関与していることを報告した。本研究では ATP 放出の細胞内シグナル機構について精管平滑筋におけるそれとの比較を行った。(方法) 実験は初代培養細胞と切片標本を用いて, 灌流法およびバッチ法にて行われ, ATP は luciferase 法にて測定された。(結果および考察) P2-受容体アゴニストの $\alpha\beta$ -methylene ATP ($\alpha\beta$ -m ATP) によってモルモット精管および回腸縦走筋から濃度依存性の ATP 放出が引き起こされた。精管におけるこの ATP 放出は U-73122, neomycin, LiCl および genistein などの PI 代謝回転阻害剤や tyrosine kinase 阻害剤によって影響を受けなかったが, ryanodine 受容体遮断剤の ruthenium red (RR) や ryanodine によって拮抗された。さらに精管培養細胞からの $\alpha\beta$ -m ATP による ATP 放出は suramin および caffeine 前投与によって拮抗された。一方, 回腸縦走筋からの ATP 放出は U-73122, BAPTA/AM, W-7 および thapsigargin によって拮抗されたが, RR や ryanodine によっては影響を受けなかった。しかし, oligomycin, CCCP などのミトコンドリア阻害剤によって, 両平滑筋からの ATP 放出はいずれも拮抗された。

以上の結果から, P2 アゴニスト刺激により回腸平滑筋では主に IP3 受容体を, また精管平滑筋では ryanodine 受容体を介した細胞内シグナルを経て ATP が放出されるものと考えられる。

29. プリン受容体刺激による CHO 細胞からの酸排出機構

福井医科大学薬理¹, 同眼科²

村松 郁延¹, 岡田 優一^{1,2}, 赤木 好男², 谷口 隆信¹

細胞内 pH は 7.4 付近に維持されており, これには細胞膜を介した H⁺ 輸送系が深く関与していると考えられている。しかし, その調節機構についてはまだ十分解明されていない。私達は近年開発されたマイクロフィジオメーターを用いて細胞外 pH をリアルタイムに計測する系を確立した。そこで, 今回はプリン受容体刺激に伴う酸排出機構について報告する。

CHO 細胞を UTP で刺激すると, 添加 20 秒付近でピークとなる一過性の強い細胞外酸性化反応 (transient EAR: extracellular acidification rate) と, それに引き続いて現れる弱いけれども持続性の酸性化反応 (steady EAR) を認めた。両反応は UTP の濃度に依存して増加し, それぞれの pEC₅₀ は transient EAR で 4.8, steady EAR では 6.1 であった。ATP も UTP と同様の反応を惹起したが, α , β -methylene ATP, ADP, adenosine などは無効であった。UTP により惹起された transient EAR, steady EAR は, Na/H exchanger inhibitor や外液から Ca を除去することで抑制された。また, UTP を持続的に処置 (10 分以上) すると反応は消失し, UTP 受容体は脱感作することが示唆された。

以上の結果より, CHO 細胞では P_{2Y} プリン受容体が刺激されると, 細胞内 Ca 遊離が惹起され, その結果 Na/H 交換が活性化されて細胞外へ H⁺ が排泄されることが明らかとなった。本研究は, 細胞内 pH 調節機構が受容体によりコントロールされることを証明したもので注目される。

30. イヌ脳底動脈における伸展誘発性ミオシン軽鎖複数部位リン酸化へのプロテインキナーゼ C α アイソフォームの関与について

静岡県立大学薬学部薬理

小原 一男, 野沢 佳代, 中山 貢一

【目的】 我々はイヌ脳底動脈において伸展誘発性収縮が静止状態に戻ってもなおミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化が高いという張力と MLC のリン酸化との乖離について報告した (第 41 回日本平滑筋学会総会)。また, MLC はプロテインキナーゼ C (PKC) によりリン酸化されることが知られている。そこで, 伸展誘発性 MLC のリン酸化への PKC アイソフォームの関与について検討した。

【方法】 雌雄雑種成犬 (体重 10-18 kg) から摘出した脳底動脈より作製したリング標本に機械刺激装置を用いて 1 mm/sec の速度で初期長の 1.5 倍に緩徐伸展を加えた。PKC の活性化の指標としての細胞質から膜フラクションへのトランスロケーションを測定した。また, MLC のリン酸化は等電点電気泳動/イムノプロット法により測定した。

【結果】 テトラエチルアンモニウム (5 mM) 存在下, 緩徐伸展刺激を 15 分間与えると, 収縮を伴わず MLC の複数のリン酸化体 (少なくとも 1, 2 および 3 リン酸化体) が増加した。イヌ脳底動脈には PKC α , δ , η および ξ の 4 種類のアイソフォームが存在するが, そのうち緩徐伸展により PKC α および δ のトランスロケーションが惹起された。PKC α および PKC δ のトランスロケーションは PKC (cPKC および nPKC) 阻害薬のカルホスチン C により抑制された。一方, PKC δ の特異的阻害薬ロトレリン (5 μ M) により PKC δ のトランスロケーションは抑制されたが, PKC α のトランスロケーションは抑制されなかった。また, MLC のリン酸化はカルホスチン C により抑制されたが, ロトレリンでは影響されなかった。

【考察】 伸展誘発性 MLC 複数部位リン酸化において PKC α は直接的に MLC をリン酸化するが PKC δ は MLC のリン酸化に関与しない可能性が示唆された。

31. モルモット盲腸紐の PKC isoform レベルにおよぼす代謝阻害の影響

三菱化学生命科学研究所¹, 日本大学生物資源科学部獣医学科生理²

小林麻須美^{1,2}, 金山 喜一², 山国 徹¹, 石田 行知¹

プロテインキナーゼ C (PKC) は、平滑筋における薬物感受性の調節に寄与する。今回はモルモット盲腸紐の PKC isoform の発現レベルにおよぼすグルコース除去、低酸素およびシアンの影響を調べた。PKC isoform は、盲腸紐の抽出液を SDS-PAGE にかけて、nitrocellulose 膜にトランスファーし、各々の isoform に対する抗体を用いて検出した。代謝阻害条件は、高濃度 KCl (40 mM) 存在下で、グルコース除去、低酸素(窒素通気)、グルコース除去+低酸素、およびシアン投与を、それぞれ 2 時間適用した。正常な栄養液に浸した盲腸紐からは PKC α , β 2, ξ および ϵ が検出され、PKC β 1 は検出されなかった。代謝阻害条件により発現に変化が認められた PKC isoform は以下の表の如くであった。

PKC	グルコース除去	低酸素	グルコース除去+低酸素	シアン (5 mM)
α			低分子やや増加	低分子やや増加
β 2		低分子増加	高分子消失・低分子増加	高分子減少・低分子増加
ϵ		低分子やや増加	低分子やや増加	低分子やや増加

グルコース除去は 2 時間処理ではモルモット盲腸紐の PKC 発現に影響を与えないことが示された。低酸素やシアンの作用は栄養液から Ca²⁺ を除去し 0.1 mM EGTA を投与すると抑制されたが、グルコース除去+低酸素の作用は完全には抑制されなかった。以上の結果から、低酸素とシアンは PKC isoform の発現変化に対して同じような作用を示し、その作用は Ca²⁺ 依存性であることが示唆される。さらにこれらの代謝阻害は低分子量 PKC を増加させ、高分子 PKC を減少させる傾向にあった。これは、高分子量がリン酸化 PKC であるとする、代謝阻害により細胞のリン酸化ポテンシャルが減少することにより、リン酸化 PKC が減少し、非リン酸化 PKC が増加するものと考えられる。

32. 脳血管および気管平滑筋の Ca²⁺ 非依存性異常収縮におけるスフィンゴ脂質と C キナーゼの役割

山口大学医学部医科学器官制御医科学講座分子細胞生理

佐藤 正史, 白尾 敏之, 三輪さおり, 轟-池田奈津子, 最上紀美子, 水上 洋一
小林 誠

血管平滑筋細胞の Ca²⁺ 非依存性収縮は、血管攣縮などの血管緊張異常の本態として注目されている。また、気管平滑筋の Ca²⁺ 非依存性収縮と気管支喘息との関連性も注目され始めている。最近、我々は、ブタ冠動脈を用いて、血管平滑筋の Ca²⁺ 非依存性収縮を引き起こす細胞内シグナル機構として、スフィンゴ脂質-Rho-kinase 経路を同定した。本研究では、脳血管および気管平滑筋の緊張調節におけるこの新規の経路の役割について検討し、さらに、Ca²⁺ 非依存性収縮を引き起こす別の因子として知られている C キナーゼ経路とのクロストークについても検討した。

血管平滑筋細胞において、スフィンゴ脂質の一種である sphingosylphosphorylcholine (SPC) は、細胞質から細胞膜への Rho-kinase の translocation とミオシン軽鎖のリン酸化の増加を引き起こした。また、脳血管および気管平滑筋のスキンド標本においては、SPC は、GTP が無い条件下でも、Ca²⁺ 非依存性収縮を引き起こした。この SPC による異常収縮は、Rho-kinase 阻害薬および dominant negative Rho-kinase の細胞内投与によって完全に阻害されたが、conventional protein kinase C (cPKC) の pseudosubstrate peptide である PKC₁₉₋₃₁ peptide では阻害されなかった。一方、スキンド標本において、phorbol ester が引き起こす Ca²⁺ 非依存性収縮は、PKC₁₉₋₃₁ peptide で完全に阻害されたが、Rho-kinase 阻害薬および dominant negative Rho-kinase の細胞内投与では阻害されなかった。以上の結果により、1) 脳血管および気管平滑筋において、SPC は、Rho-kinase の活性化を介して Ca²⁺ 非依存性の異常収縮を引き起こす細胞内シグナル分子である事、2) スフィンゴ脂質-Rho-kinase 系による異常収縮には、phorbol ester 感受性 PKC は関与しない事が解った。

33. リン酸化に依存しない平滑筋ミオシンの活性化

群馬大学医学部薬理

小浜 一弘

平滑筋ミオシンは、非リン酸化状態で精製され、ATPase 酵素としては不活性である。ミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase, MLCK と略す) により、 Ca^{2+} とカルモジュリン存在下で軽鎖がリン酸化されてはじめてその ATPase が活性化される。このリン酸化の機序により平滑筋は収縮すると考えられているが、アゴニストの種類により全くリン酸化を伴わないで平滑筋を収縮させることも可能で、リン酸化に依存しないミオシンの活性化の様式があると考えられる。私どもはこの様式を検索して来たがその手がかりができたのでこれをまとめて報告する。

MLCK はその分子の中央にキナーゼ活性ドメイン、C 末にアクチン結合ドメイン、N 末にミオシン結合ドメインをもっていて多機能性である。アクチン結合性やミオシン結合性がアクチン・ミオシン相互作用に影響を及ぼす可能性を検討するため、MLCK の cDNA を利用して種々の MLCK 断片を大腸菌内に発現させ、これのアクトミオシンに対する作用を調べた。その結果、Asp777 から始まる C 末端ミオシン結合断片にミオシンを非リン酸化のままでも活性化する作用のあることが判明した。この作用は MLCK のキナーゼ活性阻害薬存在下の MLCK でも確認でき、明らかにリン酸化に依存しない平滑筋ミオシンの活性化と言えよう。さらに MLCK 自身をプロテイン A キナーゼでリン酸化により修飾したところ、この活性化作用はさらに増強され、 V_{\max} 20 倍程度までミオシンを活性化した。Km は $0.1 \mu\text{M}$ であり、細胞内に存在する MLCK 濃度 ($3 \mu\text{M}$) で十分に説明が可能であろう。

34. ミオシン軽鎖キナーゼをノックアウトした平滑筋細胞の収縮

群馬大学医学部薬理, 明治薬科大学薬理¹

包 建軍, 大石 一彦¹, 山田 智久¹, 内田 幸宏¹, 小浜 一弘

ミオシン軽鎖キナーゼ (myosin light chain kinase, MLCK と略す) は、ミオシン軽鎖をリン酸化して、ミオシン ATPase を活性化する酵素であり、平滑筋における重要な制御蛋白質である。この MLCK はキナーゼドメインの他に、アクチン結合ドメインとミオシン結合ドメインより成り立ち、多機能性である。近年になり MLCK のアクチン結合性とミオシン結合性が平滑筋アクトミオシンの ATPase 活性に種々の作用を及ぼすことが小浜らにより次々と明らかになって来た。これらのデータはいずれも *in vitro* のもので、次の段階として、実際の収縮に制御作用を及ぼしているかどうかを検定しなくてはならない。この目的の為の第一歩として MLCK の発現を欠いた平滑筋細胞を以下の様に作成し、その収縮を測定した。

私どもは、アンチセンス法の応用として、MLCK の中央部 (キナーゼドメインを含む) の 1.4 kbp をアンチセンス方向でアデノウイルス・ベクターに挿入した。このウイルスを脳血管由来の平滑筋細胞 (GBaSM-4) に感染させることにより、アンチセンスを導入することができた。この細胞 (GBaSM-4/anti) では、ウエスタン・プロット上、MLCK の発現が著明に阻害されていた。コントロール (ウイルスを感染させただけの、GBaSM-4/cont) と GBaSM-4/anti をそれぞれコラーゲン・ゲルに包埋したのち、マグヌス管に移し、等尺性の収縮を測定した。ノルエピネフリン、A2187 及びカリクイン A をアゴニストとして収縮させた場合、GBaSM-4/anti に著明な収縮抑制がみられた。ところが、収縮に対応させて、ミオシン軽鎖のリン酸化レベルをしらべると、GBaSM-4/cont と GBaSM-4/anti は共にリン酸化が起り、差が検出されなかった。この現象は、これまで考えてこられた MLCK のキナーゼ作用では説明できないもので、上述した、アクチン結合性やミオシン結合性と関係するものかも知れない。今後、この系を用いて、MLCK のアクチン結合断片やミオシン結合断片を導入してみたい。

35. 造血細胞株におけるミオシン軽鎖の発現パターンの解析

北里大学医学部内科 IV

渡辺真理子, 郡 美佳, 高石 雅章, 堀江 良一, 東原 正明

【目的および方法】造血細胞でのミオシン軽鎖のアミノ酸配列が, 骨格筋や平滑筋のミオシン軽鎖とどの程度相同性があるのかを調べるために, 血小板・巨核球系白血病細胞株 Meg-01 よりクローニングしたところ, 様々な動物の平滑筋の 17-kDa 必須軽鎖 (MLC-3) や 20-kDa 制御軽鎖 (MLC-2) と相同性が認められた。さらに, 20-kDa 制御軽鎖のリン酸化を受けるアミノ酸残基も, ニワトリ砂囊の 20-kDa 制御軽鎖と一致しており, これらの N 末 5 個のアミノ酸残基 (Ser-1, Ser-2, Thr-9, Thr-18, Ser-19) がリン酸化を受ける可能性があることを報告した (第 42 回本大会)。

今回, 我々は様々な分化段階の造血細胞株におけるミオシン制御軽鎖を探索することを目的とし, 様々な造血細胞株より RNA を回収し, Meg-01 よりクローニングされた 20-kDa 制御軽鎖 (MLC-2A) や既知の情報をもとに, 新規ミオシン制御軽鎖のクローニングを試みた。その後, 特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い, その発現パターンを比較した。

【結果および考察】今回, 造血細胞株より新たにクローニングされた 2 種類のミオシン軽鎖のうち 1 つは (MLC-2B), MLC-2A との相同性がアミノ酸レベルで 97.7% と非常に高く, MLC-2A の isoform の一つである可能性が示唆された。発現パターンを比較すると, 解析した全ての細胞株に発現しており, ゲノムの解析結果より, MLC-2A & MLC-2B は各々 3 つの exon から成り, 18 番染色体にコードされていることが明らかとなった。もう一つのミオシン軽鎖 (MLC-2C) は, アミノ酸レベルでニワトリ砂囊の 20-kDa 制御軽鎖と完全に一致しており, マクロファージ系細胞株や血小板でのみ発現が認められた。造血細胞には少なくとも 3 種類の 20-kDa 制御軽鎖が確認でき, 異なった機能を担っている可能性が示唆される。

36. 筋線維芽細胞におけるエンドセリン-1 による細胞収縮と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化

九州大学大学院医学研究院臨床薬理, 同皮膚科

高橋 富美, 後藤多佳子¹, 草場亜矢子, 古江 増隆¹, 大槻 磐男, 笹栗 俊之

創傷治癒の過程において, 肉芽組織の収縮は重要な機構であるが, その機序についてはこれまで明らかにされていない。創部の肉芽組織形成過程で線維芽細胞から分化・増殖した筋線維芽細胞は平滑筋型アクチンの発達した束を内包し, これにより肉芽組織の収縮をもたらす。創傷治癒を進行させる。エンドセリン-1 (ET-1) は, この筋線維芽細胞を介して肉芽組織の収縮をもたらす薬物のひとつとして報告されている。

今回我々は, ラット背部皮下にクロトン油を注入して筋線維芽細胞を豊富にもつ肉芽嚢を作成し, ET-1 を用いて肉芽組織の収縮について検討した。ET-1 受容体には, ET_A , ET_B の 2 種類が存在することが知られているので, これらの受容体のアンタゴニストである BQ123 及び BQ788, ET_B 受容体のアゴニストである IRL1620 を用いて肉芽嚢の ET-1 による収縮に及ぼす影響を検討した。肉芽嚢より作製したストリップは ET-1 により濃度依存性に収縮し, その収縮は ET_A 受容体のアンタゴニストである BQ123 によってのみ阻害され, ET_B 受容体のアンタゴニストである BQ788 ではほとんど影響を受けなかった。また, 肉芽嚢より分離培養した筋線維芽細胞を用いて ET-1 によるコラーゲンゲルの収縮を観察したところ, 肉芽嚢ストリップの場合と同様の結果を得た。さらに Fura-2 を負荷した培養筋線維芽細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 動態について検討したところ ET-1, ET_B 受容体のアゴニストである IRL1620 共に一過性の細胞内ストアからの Ca^{2+} の放出を引き起こしたが, 細胞外からの持続性の Ca^{2+} の流入は ET-1 によってのみ引き起こされた。以上の結果から ET-1 による肉芽組織の収縮の過程には ET_A 受容体を介した細胞外からの持続性の Ca^{2+} 流入が大きな役割を果たしているものと思われる。

37. ウサギ肺内細気管支平滑筋における H_2O_2 による膜電位変化と弛緩作用

名古屋市立大学医学部麻酔・蘇生学，同薬理¹

服部 友紀，浅野 高行¹，斎藤 道泰¹，伊藤 猛雄¹

H_2O_2 の気道平滑筋に対する作用についてはこれまでに多数報告されているが，実際に気道抵抗に影響すると考えられる細気管支平滑筋に対する作用についての報告は少ない．今回我々は，ウサギ細気管支平滑筋に対する H_2O_2 の作用について，微小電極膜電位測定法及び等尺性張力測定法を用いて検討した．

〈結果〉 静止膜電位は， -53.4 ± 0.3 mV ($n=106$, mean \pm s.e.) であった． $3 \mu\text{M}$ acetylcholine (ACh) 投与は，oscillation を伴う膜脱分極反応を発生させた． H_2O_2 は，ACh の有無にかかわらず，同程度に，濃度依存性 ($1 \sim 50 \mu\text{M}$) かつ時間依存性 (~ 30 分) に膜を過分極させた． H_2O_2 は， $3 \mu\text{M}$ ACh 収縮を濃度依存性 ($1 \sim 50 \mu\text{M}$) に弛緩させた． H_2O_2 による膜過分極反応は，catalase, diclofenac (cyclooxygenase inhibitor), dimethylthiourea (DMTU) (hydroxy radical scavenger), 高 KCl (40 mM) 溶液によって抑制された． H_2O_2 による最大弛緩反応は，膜過分極を抑制した diclofenac, DMTU, 高 KCl (40 mM) 溶液によって，影響を受けなかった．

〈結論〉 H_2O_2 はウサギ肺内気管支平滑筋に対し，膜を過分極させ，弛緩を発生させた． H_2O_2 による膜過分極は， H_2O_2 が hydroxy radical へ代謝され，この hydroxy radical が cyclooxygenase 代謝物 (prostaglandins など) を生成させることによって発生すると考えられた．またこの組織において， H_2O_2 は，電位依存性以外の機序によってその弛緩を発生させる可能性が示唆された．

38. ウサギ気管平滑筋におけるアセチルコリン収縮に及ぼす H_2O_2 効果

名古屋市立大学医学部薬理

斎藤 道泰，浅野 高行，服部 友紀，梶栗 潤子，伊藤 猛雄

気道の炎症や過敏症において， H_2O_2 が何らかの主要な役割をしている可能性について，これまで数多くの報告がある．しかしながら，気管平滑筋におけるアゴニストによる細胞内カルシウム動員機構や収縮調節機序に関する H_2O_2 の効果については未だ不明な点が多い．ウサギ気管平滑筋を用いた細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) と収縮の同時測定法により，アセチルコリンや高濃度 K^+ 反応に及ぼす H_2O_2 の効果について検討した．アセチルコリン (ACh, $10 \mu\text{M}$) は，一過性および持続性に $[Ca^{2+}]_i$ と張力を増加させた．短時間 (5 分) 投与後， H_2O_2 は ACh による持続相の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を有意に増加させたが，ACh による収縮に影響を与えなかった．長時間 (25 分) 投与後， H_2O_2 は ACh による持続相の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えなかったが，ACh による収縮を強く抑制した．Nicardipine ($0.3 \mu\text{M}$) は，ACh の持続相の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を部分的に抑制した．Nicardipine 存在下で， H_2O_2 (5 分投与) は ACh による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に影響を与えることなく，その収縮を強く抑制した． H_2O_2 (25 分投与) は高濃度 K^+ (80 mM) 溶液による初期相および持続相の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を増加させたが，その収縮に影響を与えなかった．以上の結果より， H_2O_2 は一過性に nicardipine 感受性の Ca^{2+} 流入を増加させ，ACh による Ca^{2+} 動員機構を活性化するが，一方，収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性抑制作用により，ACh 収縮に対して抑制的に作用していることが明らかとなった．

39. フィールド刺激によるモルモット気管支平滑筋の非コリン作動性収縮に対するアミノフィリン及びコルフォルシンの効果

愛知医科大学呼吸器・アレルギー内科

服部 努, 馬場 研二, 榊原 綾子, 吉田 和仁

〔目的〕 気道における非コリン作動性興奮神経 (eNANC) 機能の病態への関わりは興味のある点である。我々は、細胞内の cAMP を上昇させるアミノフィリン (phosphodiesterase 阻害) またはコルフォルシン (adenylate cyclase 活性化) の、eNANC に対する作用について検討を行った。

〔方法〕 Hartley 系雄モルモットより左主気管支を摘出、その中央部の軟骨輪 2 分節分を切り出して平滑筋標本を作製した。標本は Krebs 液を満した標本槽に垂直に懸架して等尺性収縮を記録した。標本の両側に白金電極板を 10 mm の間隔をおいて設置し、フィールド刺激 (FS) を与えた。FS は 60 V, 1 msec pulse の単形波を 10 Hz で 45 秒間に亘って与え、発生する張力 (FS 収縮) を観察した。実験は、indomethacin 10 μ M, propranolol 1 μ M 及び atropine 2 μ M の存在下で行った。

〔結果〕 アミノフィリンとコルフォルシンは FS 収縮を濃度依存的に抑制した。アミノフィリンの反応性を、FS 収縮と、外から substance P を与えて同程度の張力を来した収縮 (SP 収縮) とで比較すると、FS 収縮の方が高かった。コルフォルシンの抑制作用は、両者で差を認めなかった。

〔考察〕 アミノフィリンとコルフォルシンは、いずれも平滑筋収縮に直接的な抑制作用を持つと考えられるが、アミノフィリンの場合は、eNANC に対しても部分的に抑制作用があり、一方コルフォルシンにはその作用が無い可能性が考えられた。Phosphodiesterase にも adenylyl cyclase にもそれぞれ subtype が存在することがわかっており、アミノフィリンは phosphodiesterase に対し非特異的に、コルフォルシンは adenylyl cyclase の一定の subtype のみに作用する。これらのことから、少なくとも adenylyl cyclase については、気道内では平滑筋組織と神経系で subtype が異なる可能性が考えられた。

40. Adrenomedullin 及び CGRP のモルモット気管, 肺血管平滑筋に対する作用について

筑波大学臨床医学系呼吸器内科

木村 透, 平野 国美, 石井 幸雄, 野村 明広, 坂本 透, 内田 義之
関沢 清久

adrenomedullin (AM) はヒト褐色細胞腫より単離されたペプチドであり、calcitonin gene-related peptide (CGRP) と一部相同性を有することが知られている。今回の研究ではモルモット気管及び肺血管平滑筋に対する AM の作用について CGRP と比較検討した。CGRP は、electrical field stimulation による気管平滑筋収縮を増強したのに対して、AM は影響を与えなかった。一方、ヒスタミンあるいはプロスタグランジン F₂ α により前収縮させた肺動脈血管平滑筋に対しては、AM は 1 nM から 1 μ M の範囲で用量依存的に弛緩反応を呈した。この弛緩反応は内皮剥離や一酸化窒素 (NO) 合成阻害薬 L-NAME 添加により影響を受けなかったことより、直接平滑筋に作用して弛緩反応を惹起しているものと考えられた。CGRP₁ 受容体拮抗剤である CGRP₈₋₃₇ は、CGRP による血管弛緩反応を用量依存的に減弱させたのに対して、AM による血管弛緩反応には影響を与えなかった。以上より、モルモット肺における AM の作用部位は血管平滑筋であり、その作用は弛緩反応であると考えられた。またその弛緩作用は、血管内皮細胞からの NO 遊離を介さず、CGRP₁ 受容体以外の血管平滑筋上の受容体を介したものであると推察された。

41. オゾン曝露後のラット気道平滑筋および肺組織における β_2 受容体機能低下；内因性IL-1 β の関与

九州大学大学院医学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¹

古藤 洋，井上 博雅，福山 聡，古森 雅志，原 信之，相沢 久道¹

〔目的〕 気道過敏性亢進と慢性気道炎症は気管支喘息の普遍的な特徴である。また喘息の動物モデルにおいて、気道炎症が気道平滑筋の β_2 受容体機能低下を引き起こすことを示唆するいくつかの報告がある。我々も最近、IL-1 β をラットに気管内投与するとGi蛋白誘導を伴って β_2 受容体機能低下が惹起されることを報告した。そこで今回は、気道過敏性亢進を伴う気道炎症モデルとしてオゾンの急性曝露を用い、気管平滑筋および末梢肺組織における β_2 受容体機能の変化について検討した。

〔対象と方法〕 ラットを自発呼吸下に3ppmのオゾンに2時間曝露した。曝露終了後24時間の時点で気管および肺組織を摘出し、気管軟骨2リング幅の気管平滑筋切片とおよそ2×2×5mmの末梢肺組織切片を作成、5mlのorgan bath内に懸垂して等尺性張力を測定した。 β_2 受容体機能はED₅₀に相当するカルバコール(CCh)で組織を前収縮させた後に、イソプロテレノール(ISO)による弛緩効果の用量反応曲線にて評価した。アデニル酸シクラーゼを直接刺激するフォルスコリンの反応性についても検討した。また、このモデルにおけるGi蛋白の関与を検討するために百日咳毒素(PTx)を、IL-1 β の関与をみるためにIL-1 β 変換酵素(ICE)阻害薬を用いた。

〔結果と考察〕 オゾン曝露により気管平滑筋、肺組織切片ともにISOに対する有意な反応性低下が認められた。組織をPTxで処理すると反応性は改善し、Gi蛋白の関与が示唆された。しかし同時に気管、肺のいずれにおいてもフォルスコリンに対する反応性も減弱しており、G蛋白より下流の変化も伴っていると考えられた。オゾン曝露前にICE阻害薬を投与してIL-1 β 産生を阻害すると β_2 受容体機能低下は抑制され、このモデルにおける β 受容体機能変化は、少なくとも部分的にはIL-1の誘導を介しているものと推測された。

42. 好酸球性気道炎症に伴うムスカリンM₂受容体機能障害におけるcalcitonin gene-related peptide(CGRP)の役割に関する検討

九州大学大学院医学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¹

本田 泰子，古藤 洋，井上 博雅，木部 敦子，松元幸一郎，原 信之，相沢 久道¹

〔目的〕 気管支喘息患者では、迷走神経節後神経末端におけるムスカリンM₂受容体を介したアセチルコリン放出抑制の障害が気道過敏性亢進に関与していると推測されている。その機序のひとつとして抗原感作動物モデルにおいて、好酸球由来のmajor basic proteinがM₂受容体拮抗剤として働くことが報告されている。我々は抗原感作により気道壁の神経細胞にcalcitonin gene-related peptide(CGRP)が誘導されること、およびその好酸球遊走活性に注目し、好酸球性気道炎症に伴うM₂受容体機能障害におけるCGRPの関与について検討した。

〔対象と方法〕 モルモットに卵白アルブミン(OVA)をday 1, 3, 5に腹腔内投与して感作、day 25に2.5% OVAを5分間吸入曝露し、その24時間後に迷走神経電気刺激に対する気道反応を測定した。感作を行わずにOVAを吸入させた動物を対照群とした。M₂受容体機能は迷走神経電気刺激後の気道収縮におけるM₂受容体拮抗薬gallamineの効果を見ることで評価した。CGRPの関与を検討するために、(1)OVA感作曝露群におけるCGRP受容体拮抗剤(CGRP 8-37)前処置の効果および(2)非感作モルモットにおけるCGRP気管内投与の効果を検討した。気道炎症の評価は気管支肺胞洗浄(BAL)で行った。

〔結果〕 対照群ではgallamineは用量依存性に電気刺激に対する反応を増強させたが、OVA感作曝露群ではこの増強効果はほとんど消失しており、M₂受容体機能障害が確認された。CGRP 8-37はM₂受容体機能障害を防止した。さらに外因性に高用量のCGRPを投与するとBAL中の好酸球数増多と共にM₂受容体機能障害も惹起された。

〔考察〕 好酸球性気道炎症におけるM₂受容体機能障害には、CGRPが重要な役割を果たしていると考えられる。

43. 手術摘出ヒト大腸平滑筋の薬理学的反応性を指標とした保存方法の検討

獨協医科大学薬理, 同第二外科¹, 国立医薬品食品衛生研究所薬理部², 日本製薬工業協会³

上川雄一郎, 渋川 朝子, 内田 幸介, 児嶋 修一, 佐久間 敦¹, 窪田 敬一¹
大野 泰雄², 奥田 英毅³

外科手術で摘出されたヒト消化管平滑筋を薬理試験に利用する際の適切な保存方法について比較検討した。文書による同意の得られた大腸癌患者 44 名(男性 28 名, 女性 16 名, 平均年齢 63.2±1.6 歳)から摘出された遠位結腸をリン酸緩衝液 (PBS), クレブス栄養液 (KBS), 最少必須培養液 (MEM) の 3 種類の保存液に浸して 4°C 冷蔵保存したときのカルバコール収縮とノルアドレナリン弛緩について経時的に検討した。一部の標本では, MEM に牛胎児血清とジメチルスルホキシドを加えた凍結保存液に浸して -80°C までゆっくり凍結させ, 1ヶ月以上保存した後解凍して, カルバコール収縮を検討した。大腸輪状平滑筋の機械的反応は, 幅約 2 mm, 長さ約 15 mm の標本を, 37°C KBS で満たした 10 ml オルガンバス内に 2 g の負荷をかけて懸垂し, 等張性トランスデューサー(日本光電 TD112S)を介してポリグラフ上に記録した。摘出ヒト大腸輪状平滑筋のカルバコール収縮は, KBS に保存したとき最も早く (24 時間後) pEC₅₀ 値の低下が認められ, MEM では 2 日後, PBS では 4 日後に有意な低下が認められた。一方, ノルアドレナリンによる最大弛緩反応は KBS では 3 日目以降, MEM では 2 日目以降, PBS では 6 日目以降有意に減弱した。1ヶ月以上凍結保存したヒト大腸輪状筋もカルバコール収縮反応を保持していたが, その pEC₅₀ 値は新鮮標本に比べて有意に低下していた。外科手術で摘出されたヒト大腸平滑筋を薬理試験に使用するときには, PBS を用いて冷蔵保存すれば少なくとも 3 日間は新鮮標本と同じ程度の反応性を保持することが示唆された。本研究は平成 10~12 年度ヒューマンサイエンス振興財団の援助を受けた (課題番号 71253)

44. プロカインおよびその関連化合物のモルモット腸管平滑筋に対する弛緩作用

日本大学松戸歯学部薬理

久保山 昇, 藤井 彰

[目的] 先に, 我々は局所麻酔薬 (LA) が, agonist 刺激によるモルモット回腸縦走筋の収縮反応を濃度依存的に抑制することを報告した。本研究では, procaine (Pro) は ACh 収縮反応を強く抑制したことから, ACh, atropine に構造類似である, Pro および代謝産物 (p-aminobenzoic acid (p-ABA), 2-diethylaminoethanol (DEAE)), 関連化合物 (procainamide (ProA)) によるモルモット腸管平滑筋に対する弛緩反応を検討した。[実験方法] ① モルモット回腸縦走筋の収縮反応は, Hartley 系モルモットの回腸縦走筋を Magnus 管に懸垂し, 収縮反応を等張性に記録した。② マウス腸管輸送反応は, ddY 系マウスを 1 群 7 匹とし, LA 皮下投与 15 分後に ACh を投与し, 15 分後に 2% 活性炭を経口投与してから 30 分後に腸管を摘出し, 炭末輸送率を算出した。③ mAChR 結合親和性は, モルモット回腸縦走筋のホモジネートを用いて radioreceptor assay により, 薬物の特異的結合を検討した。[結果] ① Pro は, 濃度依存的に ACh 収縮を強く抑制するが, 高 K⁺ 収縮に対しては, 軽度の抑制であった。p-ABA および ProA は, ほとんど抑制作用を示さなかった。逆に, DEAE は ACh および高 K⁺ 収縮を促進した。Pro は, ACh 収縮の tonic 相に対して, 濃度依存的に弛緩反応を示した。Pro は, Ca²⁺ 非存在下で, ACh 刺激により誘発される Ca²⁺ 収縮を濃度依存的に強く抑制した。しかし, 高 K⁺ による Ca²⁺ 収縮に対しては, 軽度の抑制であった。また, Pro は caffeine 誘発刺激による Ca²⁺ 遊離に対して抑制した。② LA 単独では, 用量依存的に軽度に腸管輸送反応を抑制したが, Pro および DEAE は逆に促進した。また, ACh 刺激による腸管輸送促進反応を LA は用量依存的に抑制したが, Pro には認められなかった。③ Pro は関連化合物と比較すると mAChR 結合親和性が高かった。以上の結果より, Pro は ACh と類似構造を有し, 中間鎖の ester 基が重要であることが示唆された。

45. モルモット盲腸紐におけるグルコース除去の弛緩作用機構

三菱化学生命科学研究所, 静岡大学薬学部薬理¹, 昭和大学薬学部薬理²,
Cincinnati 大学医学部生理³

石田 行知, 小原 一男¹, 中山 貢一¹, 野部 浩司^{2,3}, 百瀬 和享², Richard J. Paul³

モルモット盲腸紐に高濃度 KCl (40 mM) を投与すると, 盲腸紐は持続的な収縮反応をひきおこす。このとき, 栄養液からグルコースを除去すると, ^{45}Ca の細胞内への流入量は小さくなり, 持続的な収縮反応は抑制される (Urakawa & Holland, 1964)。盲腸紐の酸素消費量は高濃度 KCl 投与で増加し, グルコース除去により漸次抑制され, 酸素消費量変化は収縮反応持続相の変化と対応する (Urakawa et al., 1969)。これらの結果から, 盲腸紐においては, 高濃度 KCl 刺激による収縮反応の大きさと Ca^{2+} 流入量の大きさは炭水化物代謝に依存することが提唱されている。今回は, 細胞質 Ca^{2+} 濃度とミオシン軽鎖リン酸化レベルを測定し, グルコース除去による弛緩作用機構を考察した。盲腸紐の細胞質 Ca^{2+} 濃度を fura-2AM 法を用いて測定すると, 高濃度 KCl により細胞質 Ca^{2+} 濃度は増加した。栄養液からグルコースを除くと, 1 時間後には収縮反応は対照の 10% 以下に減少したが, 細胞質 Ca^{2+} 濃度は増加したままであった。ミオシン軽鎖リン酸化レベルもグルコース除去後 1 時間では増加したままであった。以上の結果は, KCl によって引き起こされる細胞質 Ca^{2+} 濃度およびミオシン軽鎖リン酸化の上昇は炭水化物代謝には直接依存していないことが示唆される。 ^{45}Ca を用いて測定した組織への Ca^{2+} 取り込み量は細胞内小器官に取り込まれる量を含んでいる可能性があるため, 細胞質の Ca^{2+} 濃度ではなく, 小器官への Ca^{2+} 取り込み過程が炭水化物代謝に依存していると解釈できる。グルコース除去後の細胞質 Ca^{2+} 濃度とミオシン軽鎖レベルは収縮反応と相関しないが, 同様の非相関は低酸素条件下でも観察される (Obara et al., 1997)。よって, グルコース除去と低酸素などの代謝阻害の盲腸紐弛緩作用機構は, 細胞質 Ca^{2+} 濃度やミオシン軽鎖リン酸化ではなく, ミオシン ATPase への ATP 供給減少に依存していることが推測される。

46. 腸管平滑筋における各種ムスカリン作動薬の M2 あるいは M3 受容体性反応の活性化効力の比較

岐阜大学農学部獣医学科家畜薬理, ロンドン大学セントジョージ医学校薬理¹

小森 成一, 海野 年弘, 岡本 寛之, Yan H-D, Prestwich S.A.¹, Zholos A.V.¹
Bolton T.B.¹

腸管平滑筋には M2 と M3 ムスカリン受容体が発現しており, M2 受容体は Gi/o G 蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼの抑制および非選択的陽イオンチャンネル電流 (Icat) の活性化に, そして M3 受容体は Gq/11 G 蛋白質を介してイノシトール三リン酸依存性 Ca^{2+} 放出にそれぞれリンクしている。本研究では, モルモット回腸縦走筋を対象として, 各種ムスカリン作動薬 (アゴニスト) のこれら 3 つの情報伝達系における活性化効力を比較検討した。Icat は Ca 放出により影響を受けるので, 細胞内 Ca^{2+} 濃度を BAPTA/ Ca^{2+} バッファーで 100 nM に固定して記録した。〈結果〉(1) カルバコール (CCh) をはじめとする 6 種類のアゴニストは, イソプレナリンで誘起した cAMP 上昇を濃度依存性 (1~300 μM) に抑制した。各アゴニストの効果は, タブシガルギンと D600 で細胞内外からの Ca^{2+} 動員を抑制した条件下でも認められた。(2) これら 6 つのアゴニストのうち CCh を含む 4 つは Icat を濃度依存性 (1~300 μM) に誘発したが, 残りの 2 つは Icat をほとんど誘発しなかった。(3) 各アゴニストで惹起された最大効果を指標として, cAMP 抑制効力と Icat 誘発効力との関係を分析した結果, 両効力の間に有意な相関は認められなかった。(4) 前出 6 つを含む 10 種類のアゴニスト (300 μM) の Ca 放出効力について Ca^{2+} 感受性 K^+ 電流を指標として測定し, Icat 誘発効力と比較した結果, 両効力の間には密接な正の相関が認められた。(5) CCh 誘発 Icat に対する各種 G 蛋白質抗体 (Gq/11, Gil, Gil/2, Gi3/o, Gi3, Gs) の効果を調べた結果, Gi3/o 抗体だけが Icat を有意に抑制した。

以上の結果に基づいて, 腸管平滑筋における M2 および M3 ムスカリン受容体の機能的発現パターンについて考察を加える。

47. β_3 -アドレナリン受容体に対する Arylethanolamine 類の構造活性相関に関する研究

東邦大学薬学部薬理

堀之内孝広, 小池 勝夫

以前に私達はモルモット胃底に機能的な β_3 -アドレナリン受容体 (β_3 -AR) が存在することを報告した。本研究では, β_3 -AR の薬理学的特徴を明らかにするため, モルモット胃底の β_3 -AR に対する Arylethanolamine 類の構造活性相関について検討したので報告する。

カテコール環の側鎖に水酸基 (-OH) を有する (-)-ノルアドレナリンと側鎖に水酸基を持たないドパミンの β_3 -AR 活性 (効力) を比較したところ, 側鎖の水酸基がなくなることで 138 倍効力が弱くなった。しかしながら, 側鎖のアミノ基に大きな置換基を導入したドパミンの誘導体である (±)-ドブタミンはドパミンより 22 倍効力が強かった。このことは, エタノールアミン側鎖 (-CH(OH)CH₂NH-) の水酸基が β_3 -AR 活性を得るのに重要であり, また, この側鎖に水酸基がなくても側鎖のアミノ基に大きな置換基を導入することで強い β_3 -AR 活性が得られることを示している。このことは側鎖にエタノールアミン構造を持ち, さらに側鎖のアミノ基に大きな置換基を有する BRL37344 (選択的 β_3 -AR 作用薬) が強い β_3 -AR 活性作用を示すことから推測できる。

カテコール環の 3 位と 4 位に水酸基を有する (-)-アドレナリンとカテコール環の 3 位に水酸基を有する (-)-フェニレフリンの β_3 -AR 活性を比較したところ, (-)-フェニレフリンの方が (-)-アドレナリンより 20 倍効力が弱かった。このことはカテコール環の 4 位の水酸基も β_3 -AR 活性を得るのに必要であることを示している。しかしながら, カテコール環の 3 位と 4 位に水酸基を有さず, 3 位に塩素原子を持つ BRL37344 が強い β_3 -AR 活性作用を示すことから, β_3 -AR 活性作用を得るためには, カテコール環の 3 位と 4 位の水酸基は必須ではなく, カテコール環の 3 位に電気陰性度の高い塩素原子を導入することで強い β_3 -AR 活性作用が得られる可能性を示唆している。

48. ラット大動脈平滑筋由来細胞 (A7r5) L 型 Ca チャネルに対する cilnidipine のユニークな抑制作用

福岡歯科大学細胞分子生物学

内田 竜司, 山崎 純, 北村 憲司

DHP 誘導体の一種である Cilnidipine は L 型チャネルだけではなく, N 型チャネルを抑制する作用を持っていることが知られている。この作用は Amlodipine でも報告されているが, その他の DHP 誘導体には認められない。こうした特異的な性質は cilnidipine と他の DHP 誘導体との構造の異なる部分 (側鎖部など) に起因することが考えられる。一方, こうした構造の違いによる DHP 誘導体の L 型チャネルに対する効果については曖昧な点が多い。そこで, L 型 Ca チャネルに対する cilnidipine の抑制効果を, ラット大動脈平滑筋由来細胞 (A7r5) を用いて, 他の DHP 誘導体と比較検討した。

Cilnidipine と nimodipine は濃度依存性に L 型 Ba 電流を抑制したが, cilnidipine は電流減衰の時間経過を速めた。このような効果は nimodipine では認められなかった。一般に, Ba 電流減衰の時間経過は一つの指数関数で近似されるが, cilnidipine で抑制された Ba 電流は二つの指数関数で近似されるようになった。一方, nimodipine で抑制された Ba 電流は対照と同様, 一つの指数関数で近似できた。また, Ba 電流減衰の時定数は膜電位依存性を持つが, cilnidipine 存在下の電流で観察された速い減衰を示す成分の時定数は膜電位依存性を持たなかった。Cilnidipine 濃度と電流減衰の時定数から得られた結果から cilnidipine は L 型チャネルと 1:1 の割合で結合し, その解離定数は 47nM であった。以上の結果から, cilnidipine は L 型チャネルに対しても他の DHP 誘導体では認められない特異的な抑制作用を持っており, その他の DHP 誘導体で考えられている静止状態・不活性化状態に結合して L 型チャネルを抑制すること以外に, 開状態のチャネルにも結合して抑制する性質を持っていることが示唆された。

49. 腸間膜微小動脈に存在する nifedipine 非感受性高電位活性化, 急速不活性化型 Ca^{2+} チャネルの薬理学的特性の検討

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理,
岡崎国立共同研究機構統合バイオサイエンスセンター生命環境研究施設¹

森田 浩光, 井上 隆司, 森 泰生¹, 伊東 祐之

腸間膜動脈最終分岐部以降の平滑筋細胞には, R 型および T 型とは性質の異なる nifedipine 非感受性高電位活性化, 急速不活性化型 Ca^{2+} チャネル (NI-CC) が優位に存在している¹. この Ca^{2+} チャネルの性質を T 型及び R 型 Ca^{2+} チャネルの種々の阻害薬について, T 型及び R 型 Ca^{2+} チャネルのクロロン ($\alpha 1\text{G}$ 及び $\alpha 1\text{E}$) を用い比較検討した.

電極内液 140 mM CsCl, 灌流液 10 mM Ba^{2+} の条件下で, R 型 Ca^{2+} チャネルの選択的阻害薬である SNX-482 (200 nM) に対し NI-CC 及び $\alpha 1\text{G}$ は感受性を示さなかったが, $\alpha 1\text{E}$ は完全に抑制された. また, T 型 Ca^{2+} チャネルを部分的に抑制する sFTX-3.3 (1 μM) 及び nimodipine (10 μM) に対しては, それぞれ NI-CC で無効及び 35% 抑制, $\alpha 1\text{G}$ で 15% 抑制及び 90% 抑制, $\alpha 1\text{E}$ で両者とも無効という性質を示した. さらに mibefradil に対しては, NI-CC, $\alpha 1\text{G}$, $\alpha 1\text{E}$ ともに同様な抑制効果を示した.

以上の結果から, NI-CC は既存の電位依存性 Ca^{2+} チャネルとは異なる薬理学的性質を有していることが示唆された.

1. Morita H, Cousins H, Onoue H, Ito Y, Inoue R., Circ Res, 85, 596-605, 1999

50. ブタ冠動脈平滑筋細胞の遅延整流性 K^+ 電流と非選択的 Class III 抗不整脈薬 Nifekalant の作用

名古屋市立大学大学院薬学研究所細胞分子薬効解析学

今泉 祐治, 大矢 進, 山村 寿男, 稲 吉温, 村木 克彦, 渡辺 稔

Nifekalant (MS-551) は非選択的な Class III 抗不整脈薬であり, 心筋細胞において I_{Kr} (KCNH2/KCNE) 以外の電流も抑制する事が知られている. 本研究では冠動脈平滑筋の遅延整流性 K^+ 電流に Nifekalant 感受性成分が存在するか, もし存在するならばそれは I_{Kr} , I_{Ks} あるいは他の K^+ 電流成分かを電気生理学的・分子生物学的に検討した. ブタ冠動脈平滑筋細胞において whole-cell clamp 下, 脱分極刺激により活性化される遅延整流性 K^+ 電流は, 心筋 I_{Kr} をほぼ完全に抑制する 10 μM の Nifekalant により全く影響を受けなかった. ブタ心筋の KCNH2 (ERG1) と KCNQ1 (KvLQT_1) を検出できるプローブを用いて RT-PCR による検討を行ったところ, ブタ冠動脈左回旋枝起始部平滑筋には KCNH2 及び KCNQ1 の mRNA はそれぞれ全く及び僅かしか発現していなかった. Western blot 及び単一細胞の蛍光抗体染色による解析では, これらのチャネルは冠動脈平滑筋で検出できなかった. 一方, 30 μM 以上の Nifekalant により +30 mV での遅延整流性 K^+ 電流は用量依存的に抑制され, その IC_{50} は 230 μM であった. この抑制作用には刺激頻度, 刺激電位及び保持電位に対する有意な依存性は認められなかった. RT-PCR を用いた解析によりブタ冠動脈平滑筋には $\text{Kv}1.5$, $\text{Kv}2.1$ と $\text{Kv}2.2$ が検出されたが $\text{Kv}1.2$ は見られなかった. 単一細胞の蛍光抗体染色による解析でも $\text{Kv}1.5$ と $\text{Kv}2.1$ が細胞膜へ発現していることが確認された. 1 mM Nifekalant はブタ冠動脈平滑筋細胞の外向き電流を約 80% 抑制するため, 4-aminopyridine ($\text{Kv}1.5$ に相当すると推測される 60% 程度の電流抑制) と異なり, 同細胞における主な遅延整流性 K^+ 電流成分と推測される $\text{Kv}1.5$ と $\text{Kv}2.1$ の双方を抑制すると考えられる. その効力は I_{Kr} (KCNH2/KCNE) に対する抑制作用の 200 分の 1 程度と推測された.

51. 血管平滑筋で観察された外液 Na 除去誘発細胞内 Ca 濃度上昇と KB-R7943 の効果について

名古屋市立大学大学院薬学研究所細胞分子薬効解析学

村木 克彦, 高井 伸彦, 伊藤 智洋, 山田 亜紀, 今泉 祐治

[目的] 血管平滑筋を Na 除去溶液で灌流すると細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇と収縮が生じることが知られている。この Ca 動員には、Na-Ca 交換機構の関与が示唆されているが、不明な点も多い。そこで本研究では、単一ラット頸動脈平滑筋細胞(SMC)を用いて、外液 Na 除去誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構について検討した。

[方法] コラゲナーゼ処理により得られた SMC に Fura2AM を負荷し、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化を Argus50 及び Argus HisCa で解析した。

[結果] SMC を Na 除去溶液で灌流すると $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が観察された(静止時: 131 ± 8 nM, Na 除去溶液灌流時: 527 ± 43 nM)。この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対して、D600 およびリアノジンは無効であった。一方外液 Ca 非存在下では、Na 除去誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は消失した。また KB-R7943 は濃度依存的に Na 除去誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制し、その 50% 抑制濃度は $3.5 \mu\text{M}$ であった。

[考察] SMC で観察された Na 除去誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は、外液 Ca 依存性であること、KB-R7943 で効果的に抑制されたことから、Na-Ca 交換機構の逆方向輸送系により細胞外から Ca が流入して引き起こされた可能性が高い。また同様な Na-Ca 交換機構を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が、血管内皮細胞でも観察されている。以上のことから、生体位における血管緊張制御への Na-Ca 交換機構の関与が示唆された。

52. 正常血圧および脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットの頸動脈平滑筋におけるベラパミル感受性および非感受性経路を介したカルシウム流入による収縮反応の比較

近畿大学薬学部機能形態学

関口富美子, 砂野 哲

脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) および正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) の頸動脈平滑筋におけるシクロピアゾン酸 (CPA) およびノルアドレナリン (NA) 存在下の細胞外 Ca^{2+} 流入による収縮反応をベラパミル (Vera) 感受性、非感受性の部分に分け比較、検討した。Vera 非感受性の収縮に対する SK & F 96365 (Ca^{2+} 貯蔵部位作動性 Ca^{2+} チャネル (SOCC) 阻害薬) の効果についても同様に検討した。実験には 16 週齢、雄性の SHRSP と WKY から摘出した頸動脈を使用した。頸動脈は幅 1 mm、長さ 15 mm の内皮を除去した帯状標本とし、張力トランスジューサーを用いて張力変化を等尺性に測定した。細胞外 Ca^{2+} 除去下、CPA (10^{-5} M) を作用させ、その 20 min 後に $CaCl_2$ 2 mM を加えると WKY 標本では弱い一過性収縮が、SHRSP 標本では強い持続性収縮がみられた。Vera (10^{-5} M) 存在下では SHRSP 標本の収縮は強く抑制されたが、WKY 標本の収縮はほとんど影響されなかった。Vera 存在下で残存した収縮反応は SK & F 96365 (10^{-5} M) を作用させることで完全に消失した。SK & F 96365 で抑制された収縮は WKY 標本に比べ SHRSP 標本で減少していた。同様に細胞外 Ca^{2+} 除去下、NA (10^{-5} M) 作用させた後、細胞外に $CaCl_2$ 2 mM を加えた実験では、両標本において強い持続性収縮がみられた。Vera 存在下では WKY 標本で約 50%、SHRSP 標本で約 80% の収縮が抑制された。Vera と SK & F 96365 の存在下では SHRSP 標本の収縮反応はほぼ完全に消失したが、WKY 標本では約 10% の収縮反応が残存した。以上より、SHRSP 頸動脈平滑筋では CPA、NA どちらの存在下においても細胞外 Ca^{2+} 流入の大部分は L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) を介したものであること、また WKY 標本に比べ SOCC を介した Ca^{2+} 流入は減少していることが示された。WKY 標本の NA 存在下の Ca^{2+} 流入には VDCC、SOCC 以外の経路が一部関与している可能性が示唆された。

53. モルモット鼻粘膜血管の α_1 -アドレナリン受容体について

東邦大学医学部薬理, 広島大学医学部耳鼻咽喉科¹

水流 弘通, 谷光 徳晃¹, 平位 知久¹, 夜陣 紘治¹

【目的】 アドレナリン受容体作用薬の鼻粘膜血管収縮作用は, 主に α_1 -受容体を介することが報告されている。しかるに近年, α_1 -アドレナリン受容体は, α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} -サブタイプに分類され, また prazosin などの拮抗薬に対する感受性によって, α_{1H} , α_{1L} , α_{1N} という分類も示されている。そこで本研究では, 鼻粘膜血管の α -アドレナリン受容体の性質について検討した。【方法】 雄性 Hartley 系モルモットを麻酔, 放血致死後, 左右の鼻中隔粘膜を摘出した。短冊状標本を作成し, これを Krebs' bicarbonate 液 (37°C, 95% O₂+5% CO₂ 通気) を入れた組織浴槽内に懸垂して, 等尺性張力変化を記録した。なお実験は, 神経性取込み阻害薬 desmethylimipramine, 非神経性取込み阻害薬 corticosterone, β -アドレナリン受容体拮抗薬 propranolol の存在下で行った。【結果】 α -アドレナリン受容体作用薬の norepinephrine (NE) と oxymetazoline (OX), α_{1A} 選択性の NS-49 ((R)-(-)-3'-(2-amino-1-hydroxyethyl)-4'-fluoromethane sulfonanilide), および α_2 選択性の clonidine (CL) の intrinsic activity の序列は, NE>NS-49>OX>>CL であった。pD₂ 値は NE, 5.2; NS-49, 5.1; OX, 6.1 で, CL は算出できなかった。また, NE 収縮に対する α_1 -拮抗薬の抑制効果を Schild plot で比較すると, 1) prazosin は競合的に拮抗するが, pA₂ 値は 8.0 で, 9 よりもかなり低かった。2) α_{1A} -拮抗薬の WB4101 と 5-methylurapidil は NE 収縮に競合的に拮抗し, pA₂ 値はほぼ同じ 7.8 であった。3) α_{1B} -拮抗薬 spiperone と α_{1D} -拮抗薬 BMY 7378 は非競合的に拮抗を示した。4) 選択的 α_{1L} -拮抗薬 JTH-601 (3-(N-[2-(4-hydroxy-2-isopropyl-5-methylphenoxy) ethyl]-N-methyl-aminomethyl)-4-methoxy-2,5,6-trimethylphenol) は競合的に拮抗を示し, pA₂ 値は 8.1 と最も高かった。【結論】 モルモット鼻粘膜血管の NE 収縮は α_{1A} ないし α_{1L} サブタイプを介していると考えられる。

54. ラット摘出胸部大動脈筋のリゾホスファチジルコリン誘発収縮増強作用に対する genistein および PD98059 の影響

星薬科大学医薬品化学研究所機能形態学

末永 浩, 鎌田 勝雄

【目的】 リゾホスファチジルコリン (LPC) は, 高脂血症等による循環器障害の原因物質として考えられている。LPC はチロシンキナーゼおよびマップキナーゼを活性化させることにより細胞増殖作用を示すことが報告されている。しかしながら LPC によるこれらの酵素の活性化と血管収縮反応との関連についての報告はほとんどない。そこで今回, 血管平滑筋の収縮反応に対する LPC の影響について検討した。

【方法】 Wistar 系雄性ラットより胸部大動脈を摘出し, 内皮細胞を除去したラセン状標本を作成した。標本の反応は等尺性に記録した。また一部の標本は, 薬物処置後急速冷凍しタンパク質を抽出した後, Western blot 法を用いてタンパク質チロシン残基のリン酸化量を測定した。

【結果】 LPC (10⁻⁵ M) を単独処置しても収縮反応はみられなかったが LPC 処置により high K⁺ および UK14,304 による収縮反応は著明に増大した。LPC による収縮増強作用は genistein により抑制された。一方 daidzein は抑制作用をほとんど示さなかった。LPC による収縮増強作用は PD98059 によっても抑制された。Western blot 法により LPC は 42, 44 kDa をはじめ数種類のタンパク質のチロシン残基のリン酸化量を増大させた。このリン酸化量の増大は genistein により抑制された。また, LPC による 42, 44 kDa のタンパク質のチロシン残基のリン酸化量の増大は PD98059 によっても抑制された。

【考察】 LPC は血管平滑筋のチロシンキナーゼおよび ERK-マップキナーゼを活性化させることにより収縮反応を増大させることが示唆された。

55. ウサギ脳底動脈ヒスタミン誘発収縮に対する低 Cl 溶液の効果

福岡歯科大学細胞分子生物学, 川崎医療福祉大学医療技術学科¹,
北海道医療大学臨床薬理毒理学²

北村 憲司, 西島 博明¹, 内田 竜司, 山崎 純, 島村 佳一²

収縮に対する Cl の役割を検討するため, ウサギ脳底動脈を用いて, ヒスタミン (10 μ M) と 67 mM K 溶液で誘発された収縮に対する低 Cl 溶液と Cl チャネル遮断薬の効果を検討した. ヒスタミンによる収縮は初期に起こる一過性の収縮とそれに続く持続性の収縮に分けられ, ニフルム酸やフルフェナム酸は一過性収縮を抑制し, また持続性収縮の立ち上がり速度を抑制した. しかし, K 収縮には殆ど影響しなかった. 灌流液の Cl イオンを難透過性のアスパラギン酸やグルタミン酸に置換すると, ヒスタミン収縮は著明に抑制された. また, メタンスルホン酸やイセチオン酸に置換すると灌流開始後 30 分では有意な抑制は認められなかったが, 更に灌流を続けるとヒスタミン収縮は抑制された. 一方, 易透過性のプロピオン酸は一過性に収縮を増強させた後, 抑制した. また, 酢酸への置換はヒスタミン収縮を若干増強し, 抑制は起こらなかった. 置換した陰イオン種によるこの違いは陰イオンの Cl チャネル透過性の違いと相関があるように思われ, 透過性の低い陰イオンが選択的にヒスタミン収縮を抑制すると考えられた. 難透過性の陰イオン置換によるヒスタミン収縮抑制は一過性収縮と持続性収縮両者で観察され, 持続性収縮の立ち上がり速度は抑制された. 無 Ca 溶液灌流下で観察される一過性のヒスタミン誘発収縮に対して, 低 Cl 溶液 (メタンスルホン酸に置換) は時間依存性に収縮を抑制した. 易透過性の酢酸に置換した場合は, 持続性収縮の大きさは増加したが, 立ち上がり速度は抑制された. Thapsigargin や cyclopiazonic acid を投与した場合も同様な結果が得られた. 以上のことから, Cl 透過性を低下させると思われる種々の実験条件下で観察されるヒスタミン誘発収縮の抑制に共通して認められる効果として, 細胞内貯蔵部位からの Ca 遊離に対する抑制効果が考えられ, この機構に Cl が何らかの役割も持っていることが示唆された.

56. 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ (15d-PGJ₂) による血管平滑筋細胞の再分化誘導

国立循環器病センター腎臓高血圧内科, 同薬理部¹, 九州大学大学院医学研究院臨床薬理²

三輪 宜一, 田場 洋二², 宮城めぐみ², 井上 裕康¹, 河野 雄平, 笹栗 俊之²

[目的] 血管平滑筋分化のメカニズムを解明するためには, 培養系における細胞分化モデルの構築が欠かせないが, いまだ確立されたものはない. 我々は今回, PPAR γ の天然リガンドとして最近注目されている 15d-PGJ₂ が平滑筋細胞のフェノタイプに及ぼす影響について, 平滑筋特異的分化マーカーの発現を観察することにより検討を加えた. [方法] ヒト臍帯血管から Explant 法により採取した平滑筋細胞を, ウシ胎児血清 (10%) および bFGF (5 ng/ml) 添加 DMEM 中で培養し, 15d-PGJ₂ (12 μ M) を作用させた. mRNA の発現は RT-PCR で, 蛋白発現はウェスタンブロットで解析した. [結果] 対数増殖期の細胞に 15d-PGJ₂ を長期間投与することにより, 平滑筋特異的ミオシン重鎖 SM1/SM2, カルボニン h1, 平滑筋 α -アクチンの発現が増加した. しかし, 高度に分化した平滑筋のマーカーとされる SM2 の発現は, 中膜平滑筋に比べるとかなり低いレベルに留まった. そこで, 細胞をコンフルエントになるまで増殖させ, 48 時間の無血清培養で G₀ 期に同調した後, 15d-PGJ₂ 存在下で培養した. すると 4 日後より平滑筋細胞は凝集を開始し, 最終的には肉眼的な結節を形成した. 結節内の平滑筋細胞は, 結節を形成していない細胞に比べて高いレベルの SM2 を発現しており, その発現レベルは 28 日後には中膜平滑筋のレベルにほぼ匹敵した. [結論] これらの結果は 15d-PGJ₂ が強力な平滑筋分化誘導因子であることを示すが, 高度な分化を誘導するには細胞密度などの条件が適合する必要があると考えられた. 平滑筋分化を誘導する生理活性物質は少なく, 血管病変の予防・治療への応用が期待される. 一方我々は, シェアストレスにより内皮細胞から 15d-PGJ₂ が産生されることを確認しており, 15d-PGJ₂ は新たな内皮由来平滑筋制御物質としても注目される.

57. プタ子宮におけるプロスタノイド受容体分布の筋層差

酪農学園大学獣医学部薬理

北澤多喜雄, 沙衣布扎提, 米克 熱木, 田島 剛, 種池 哲朗

【目的】我々は、これまでにプタ子宮筋収縮に対する prostaglandin (PG) D_2 , PGF $_{2\alpha}$, PGE $_1$, PGE $_2$ 及び PGI $_2$ の作用を *in vitro* で検討し、プタ子宮には収縮性 EP, FP 受容体及び弛緩性 EP, DP 受容体が存在することを明らかにしている (第 74 回日本薬理学会年会)。今回は各種プロスタノイド受容体に特異的な作動薬を用い、プロスタノイド受容体の分布が縦走筋 (LM) 及び輪走筋 (CM) 間で異なるか否かを検討した。【方法】プタ (発情前期) 子宮から得た LM 及び CM 標本を Krebs 液 (37°C) を満たした浴槽中に懸垂し機械的活性を等尺性に測定した。各作動薬を浴槽内に 5 分間隔で適用し誘起される反応を自発収縮高または波形下面積 (AUC) の変化から解析した。【成績】1. BW-245C (DP) は、LM 及び CM の自発収縮を濃度依存性に抑制した。IC $_{50}$, 最大抑制率は CM では 15 nM, 100%, LM では 150 nM, 60% であり、抑制作用は CM において著明であった。2. Cloprostenol (FP) は、1 nM から LM の収縮活性を濃度依存性に増加させた (EC $_{50}$ =9.4 nM)。しかし、CM での増加作用の発現には高濃度 (100 nM) が必要であった。3. Cicaprost (IP>EP $_3$ >EP $_1$) は、低濃度 (10 nM) から CM の自発収縮を抑制したが、LM では抑制を起さず高濃度 (1 μ M) で収縮活性を増加させた。4. Iloprost (IP \geq EP $_1$ \geq EP $_3$) は、LM, CM の自発収縮活性を 100 nM より増加させた。SC19220 (EP $_1$ 受容体遮断薬) は、この増加を抑制しなかった。10 μ M iloprost は、自発収縮の AUC を LM では 5 倍、CM では 1.4 倍に増加した。5. Sulprostone (EP $_3$ >EP $_1$ >FP) は LM, CM いずれの収縮活性も増加させた。この増加作用は LM で顕著であった。【結論】プタ子宮において収縮性プロスタノイド受容体 (FP, EP $_3$) を介する反応は LM で、弛緩性プロスタノイド受容体 (DP, IP) を介する反応は CM で著明に発現した。この成績は、各受容体の分布密度が筋層により異なることを示唆する。

58. ラット子宮平滑筋細胞の非選択性陽イオンチャンネルの性質と収縮制御における役割

広島大学医学部産婦人科

三好 博史, 大濱 紘三

子宮収縮に関しては多くの報告がされてきたが、陣痛収縮の周期性を制御する機構については十分に解明されていない。子宮平滑筋細胞は自然な脱分極により Ca チャンネルが規則的に開口し収縮が起こると考えられている。今回我々は妊娠ラット子宮平滑筋細胞において自然脱分極との関連が推測される非選択性陽イオンチャンネル (Non Selective Cation Channel, 以下 NSCC) の記録に成功したので、その性質と収縮制御における役割について検討する。妊娠 18-21 日のラット子宮より酵素法で単離した平滑筋細胞に whole cell patch clamp 法を使用した。Cs による置換、阻害剤で K および Ca 電流を抑制し NSCC 電流を分離した。得られた電流は電位依存性のない矩形電流であり細胞外 Na 濃度に依存していた。ランタン (La) に高い感受性 (Kd=2.4 μ M) を示し 30 μ M により阻害されることよりこのチャンネルは NSCC と判断した。NSCC は他の一価イオンも通過させ、それぞれのイオンの逆転電位は K; 8.6 \pm 2.7 mV (n=6), Cs; -0.5 \pm 3.3 mV (n=7), Na; -1.3 \pm 2.3 mV (n=6), Li; -7.0 \pm 2.2 mV (n=7) と計測され、透過性は K>Cs>Na>Li の順であった。これらの性質は血管平滑筋細胞などの NSCC と一致していた。NSCC 電流は静止電位-50mV においては持続性内向き電流であることより、膜を脱分極させる機序と考えられた。細胞外 Mg により NSCC 電流は濃度依存性 (Kd=0.32 mM) に阻害され、Mg の子宮収縮抑制機構の一つと考えられた。また、NSCC は小さいながらも Ca の透過性も有しており、Ca 流入機構としての可能性も示唆された。NSCC に関する研究は早産予防をはじめ周産期医学の発展に貢献すると期待される。

59. 妊娠末期ヒト子宮筋における新規切迫早産治療薬 KUR-1246 の収縮抑制効果とその機序に関する研究

福岡大学医学部産婦人科, キッセイ薬品工業薬理研究所¹

井上 善仁, 西岡 智子, 小林 護¹, 小嶋 正三¹, 赤羽 増夫¹, 瓦林達比古

[目的] アドレナリン β_2 作用薬の陣痛抑制効果のばらつきの原因を解明し, 新規切迫早産治療薬である KUR-1246 の妊娠ヒト子宮筋収縮抑制のメカニズムを検討することを目的とした. [方法] 患者の同意を得たうえで帝王切開時に採取した子宮筋切片の等尺性収縮を記録し, isoproterenol, ritodrine, KUR-1246 による収縮抑制効果を測定した. また微小電極法を用いて抑制時の静止膜電位を測定した. さらに同一の筋切片を用いて種々の濃度の β 受容体拮抗薬, [³H] dihydroalprenolol ([³H] DHA) 及び調整した粗子宮筋細胞膜を含む反応混合液を 37°C でインキュベートした後, 細胞膜 β 受容体アッセイを行った. [成績] 収縮抑制が著明な筋束の膜電位は全ての薬剤で過分極したが, 収縮抑制のない筋束ではこの過分極は認められなかった. 一方 1 μ M の isoproterenol による自発収縮抑制率 100% の子宮筋束から調整された細胞膜の [³H] DHA 最大結合部位数は約 80 fmol/mg membrane protein であった. 一方, 自発収縮抑制率 25% の子宮筋束から調整された細胞膜の [³H] DHA 最大結合部位数は約 20 fmol/mg membrane protein であり, 100% 抑制率の場合と比べて, 約 1/4 に低下していた. [結論] β_2 作用薬の妊娠末期ヒト子宮筋における収縮抑制効果のばらつきは, 子宮筋の β_2 受容体密度に依存していること, および KUR-1246 を含む β_2 作用薬は子宮筋の膜電位を過分極することにより収縮抑制作用を示すことが分かった.

60. ラット輸精管平滑筋における早期不活性化 K⁺ チャンネル構成サブユニットの分子同定と機能発現

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学

鈴木谷枝子, 大矢 進, 波多野紀行, 奥 琢磨, 今泉 祐治

早期不活性化 K⁺ チャンネルは輸精管や膀胱等の膜興奮性の高い平滑筋細胞において高発現しており, 活動電位の波形や発火頻度の調節に重要な役割を果たしている. 第 41 回日本平滑筋学会総会において, われわれはラット輸精管平滑筋の早期不活性化 K⁺ チャンネルが Kv4.2 及び Kv4.3L から構成されることを見出すとともに, HEK293 細胞発現系においてそれらの電流不活性化特性が輸精管平滑筋細胞のものと比較して有意に異なることを報告した. 最近, Kv4 サブファミリーと特異的に結合し, その膜移行や電流特性に影響を及ぼすヒト由来 K⁺ チャンネル結合タンパク (K⁺ Channel-Interacting Protein 1-3; KChIP1-3) が同定され, 神経細胞では KChIP1 及び KChIP3, 心筋細胞では KChIP2 が高発現していることが報告された. 本研究では, ラット輸精管平滑筋に発現する Kv4 及び KChIP サブタイプを同定するとともに, HEK293 細胞発現系を用いて電流不活性化特性を比較検討した.

競合的 PCR 実験及び免疫細胞染色実験の結果, ラット心室筋では Kv4.2 及び Kv4.3L が共発現しているのに対して, ラット輸精管平滑筋では Kv4.3L のみが発現しており, A 型 K⁺ チャンネルが Kv4.3L のホモ四量体により構成されることが示唆された. また, ラット由来 KChIP1-3 はヒトホモログと高い相同性を有しており, RT-PCR 実験により輸精管平滑筋では KChIP3 が Kv4.3L の修飾タンパクとして機能している可能性が示された. KChIP3 は胃, 膀胱等の他の平滑筋にも比較的高発現していた. しかし, われわれが単離した 2 種の新規 KChIP2 アイソフォーム (KChIP2S/2L) (Ohya *et al.*, BBRC 282, 96, 2001) はいずれも輸精管平滑筋にはほとんど発現していなかった. そこで, ラット輸精管平滑筋細胞及び Kv4.3L/KChIP3 共発現 HEK293 細胞を用いて早期不活性化 K⁺ 電流の不活性化特性について比較検討した.

61. 高血圧自然発症ラット胃標本の K^+ 収縮における内在神経関与の異常

近畿大学薬学部機能形態学

砂野 哲, 四宮 一昭, 関口富美子

高 K^+ による平滑筋の収縮に内在自律神経からの伝達物質の遊離が影響をおよぼしていることが知られている。また、高血圧自然発症ラットの血管標本では自律神経支配、ことに交感神経支配に異常があることも報告されている。本実験では血管以外の平滑筋臓器の高 K^+ 収縮において自律神経の影響が高血圧自然発症ラット (SHRSP) と正常血圧ラット (WKY) で差がみられるか否かを、胃底部輪状標本を用いて検討した。

胃底部標本は細胞外 K^+ 上昇に反応して濃度依存性の収縮を示し、 K^+ 濃度 40 mM 以上ではこの収縮に一過性の第 1 相と持続性の第 2 相がみられた。とくに、 K^+ 50 mM による収縮では第 2 相の大きさが WKY 標本に比較して SHRSP 標本において著明に減弱した。脱分極筋の Ca^{2+} による収縮には差がみられず、平滑筋の収縮反応には SHRSP, WKY 標本間の差がないことが明らかとなった。アトロピンは両標本において K^+ 収縮の第 1 相に影響しなかったが、第 2 相の収縮は WKY 標本で著明に抑制されたのに対し、SHRSP 標本ではほとんど影響されなかった。プラazosin、ヨヒンビンおよびプロプラノロールは第 1, 第 2 相ともに軽度の影響を与えたのみであった。L^ω-nitro-L-arginine は第 1, 第 2 相ともに増強したが、とくに第 2 相における増強効果は SHRSP 標本で著明であった。以上より、胃平滑筋の K^+ 収縮は内在自律神経、とくにアセチルコリン作動性神経と一酸化窒素神経の影響をうけるが、SHRSP 標本では前者が減弱しており、後者は増強していてこれが両標本における第 2 相の差につながることを示唆された。

62. 回腸内カプサイシン投与の空腹期上部消化管運動抑制効果とその作用機序

東北大学医学部第 1 外科

金 学林, 柴田 近, 内籾 広郎, 舟山 裕士, 福島 浩平, 上野 達也
北山 卓, 西條 文人, 松野 正紀, 佐々木 巖

カプサイシンは唐辛子の辛みの主成分であり、知覚神経に作用することが知られている。一方、空腹期の消化管には伝播性強収縮 (MMC) と呼ばれる収縮が胃から回腸へと伝播する現象が周期的に出現することが知られているが、その制御機構については不明な点が多い。【目的】回腸内カプサイシン投与の空腹期上部消化管運動に対する効果、およびその作用機序について検討すること。【方法】雑種成犬を用い、胃体部、胃前庭部、十二指腸、近位空腸、の計 4 カ所に消化管運動測定用の strain gauge force transducer を縫着した。回盲弁から 30 cm 口側の回腸にカプサイシン投与用のシリコンチューブを挿入・固定した。2 週間の回復期間を置き、意識下で運動測定を行った。回腸内投与は胃における MMC の phase III が始まってから 10 分後におこなった。回腸内に生食 10 ml (control)、カプサイシン 1, 2, 5, 10 mg を投与し、消化管運動に対する効果を検討した。また、カプサイシン 10 mg の上部消化管運動抑制効果に対する L-NAME (nitric oxide 合成阻害剤)、FK224 (neurokinin 1 拮抗剤)、Phentolamine + Propranolol (アルファ、ベータ受容体拮抗剤)、Naloxone (オピオイド受容体拮抗剤) の影響を検討した。【結果】カプサイシンは胃体部と前庭部の運動を全ての用量で抑制した。十二指腸、近位空腸の運動は 1, 2 mg では影響されなかったが、5, 10 mg では抑制された。全ての部位で抑制の程度に用量依存性が認められた。また、拮抗剤はカプサイシンによる胃体部、胃前庭部、十二指腸、近位空腸での運動抑制効果に何ら影響しなかった。【結語】回腸内に投与されたカプサイシンが空腹期の消化管運動を抑制したことから、回腸に分布する capsaicin-sensitive afferent nerve が空腹期の上部消化管運動制御に関与している可能性が示された。

63. マウス上部十二指腸運動抑制効果について

岡山短期大学 食物栄養学科

山里 晃弘

マウス(雄)を撲殺した後、幽門直肛門側より長さ約1 cmの上部十二指腸を摘出し実験に用い、縦走筋方向の運動をアイソトローニックトランスデューサを介して記録した。電気刺激は20 Hz, 0.5 msec, 20-30 Vで行った。電気刺激によって上部十二指腸に抑制効果あるいは亢進効果が誘起された。この亢進効果はatropineの投与により抑制効果に変わった。また抑制効果に対してはatropineは無効果であった。いずれの抑制効果に対してもguanethidineは無効果であったが、C6投与後にはこの抑制効果はわずかに減弱した。Atropineとguanethidineの同時投与後の刺激による抑制効果はnaloxoneの投与により著しく減弱したが、消失はしなかった。またatropineとguanethidine投与後の抑制効果はL-NAME(N- ω -Nitro-L-arginine-methyl ester)の投与によって顕著に減弱されるかあるいは亢進効果に変わった。このL-NAMEによって減弱あるいは亢進効果に変わった電気刺激効果はL-arginineによって対照あるいはatropineとguanethidine同時投与後の抑制効果とほぼ同様の抑制効果を誘起させた。電気刺激による抑制効果はTTXの投与により消失あるいは顕著に減弱した。これらの結果は電気刺激による抑制効果は神経性に誘起され、その伝達物質はNOであると考えられる。

64. マウス腸管運動へのオレキシンの作用

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻応用薬理

畑 文明, 佐藤 友治, 打田 光宏, 藤田 秋一, 竹内 正吉

最近、新しいペプチド、orexin A, Bが視床下部外側野に局在していることが発見された。摂食との関係に興味を持たれ、腸管にもorexin A, Bとそれらの受容体が存在していることが報告された。我々は、マウス腸管でのオレキシンの作用、とくに非アドレナリン性弛緩への関与を検討した。[方法] ICRマウスから十二指腸、空腸、回腸を摘出し、縦走筋方向の運動をマグヌス法で記録した。また、1 μ M atropine, 5 μ M guanethidine存在下に、経壁電気刺激(EFS; 10 Hz, 0.5 msec duration, 30 V)を行い非アドレナリン性非コリン性(NANC)の弛緩を記録した。[結果] 1. orexin A (~100 nM)は十二指腸、空腸、回腸において収縮反応を生じた。これらの反応はatropineあるいはtetrodotoxinによりほぼ完全に抑制されたことから、ACh遊離を介した反応であることが示唆された。2. この収縮はorexin Aを繰り返し適用することにより見られなくなった(脱感作現象)。EFSにより収縮を生じたが、orexin A脱感作による影響を受けなかった。3. 一方atropine存在下に、orexin Aは空腸で弛緩を生じた。十二指腸、回腸では作用が弱くごく小さな弛緩を生じた。EFSによっても弛緩を生じた。4. orexin Aの繰り返し適用により、弛緩反応にも脱感作が生じた。5. 空腸でのEFSによるNANC性弛緩は、orexin A脱感作後、55%抑制された。また一酸化窒素(NO)合成阻害薬のL-NOARG処置により47%抑制された。6. L-NOARGを処置後、orexin A脱感作してもそれ以上抑制されなかった。7. 外から適用したorexin Aによる弛緩はL-NOARGにより完全に抑制された。[考察] マウス腸管において、外から適用したorexinはコリナージック神経を介して収縮反応を生じることが示唆された。一方、EFSによるNANC性弛緩はorexinによりNOを介して部分的にメディエイトされていることが示唆された。

65. モルモット回腸壁内神経叢からの acetylcholine 遊離に対する neuropeptide FF 類似物である 1 DMe の作用

大阪府立大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻応用薬理,
Ins. Pharmacol. Biol. Struc. C.N.R.S.¹

竹内 正吉, 藤田 秋一, 後藤 洋人, Michel Roumy¹, Jean-Marie Zajac¹
畑 文明

Neuropeptide FF は抗 opioid 活性を持つ神経伝達物質である。以前、我々はモルモット回腸壁内神経叢において、ムスカリン受容体を介した autoinhibition 機構が十分機能していない条件下で、opioid が acetylcholine (ACh) 遊離を抑制することを報告した。今回、neuropeptide FF の安定な類似物である 1 DMe の ACh 遊離に対する作用を検討した。

【方法】 モルモットから、壁内神経叢の付着した回腸縦走筋標本を作成した。標本を physostigmine と choline を含む浴液で還流した後、電気刺激 (50 V, 0.5 msec, 10 Hz, 20 秒間) を行った。浴液中に遊離してくる ACh を HPLC で定量した。

【結果および考察】 Atropine 存在下において、1 DMe は濃度依存性に自発性および電気刺激誘発性 ACh 遊離を増加した。Naloxone もまた、両遊離を増加した。1 DMe と Naloxone の促進作用は相加的ではなかった。Atropine 非存在下では、1 DMe は ACh 遊離に効果を示さなかった。Morphine は atropine 存在下において自発性および電気刺激誘発性 ACh 遊離を抑制した。1 DMe は naloxone と同じく、morphine により抑制された電気刺激誘発性 ACh 遊離を回復した。両薬物を併用しても、それぞれ単独で用いたときと同程度の回復しか得られなかった。1 DMe の opioid 作用への特異性を調べるために、norepinephrine による ACh 遊離抑制に対する 1 DMe の作用を調べたところ、1 DMe は全く norepinephrine による抑制に対して作用を示さなかった。これらの結果は neuropeptide FF 類似物である 1 DMe は ACh 遊離を抑制している内因性 opioid の作用と拮抗することにより、モルモット回腸壁内神経叢からの ACh 遊離に対して促進作用を示すものと思われる。

66. 消化管平滑筋収縮を制御する常在型マクロファージの細胞生物学的検討

東京大学大学院農学生命科学研究科放射性同位元素施設, 同獣医薬理¹

佐藤 晃一, 堀 正敏¹, 尾崎 博¹, 唐木 英明¹

【目的】第 42 回平滑筋学会総会において、消化管平滑筋の筋間層に分布する常在型マクロファージが、LPS 刺激により iNOS ならびに COX-2 の誘導を介して消化管運動を制御することを明らかにし、敗血症時の消化管運動不全における発症機構の一因となっている可能性を示唆した。今回我々は、常在型マクロファージの単離法を確立し、電気生理学的手法ならびに Ca-imaging を用いることにより、その細胞生物学的特性を解析した。【結果】単離したマクロファージ様細胞は、Texas Red-dextran (70,000 M.W.) に対して貪食能を示した。また、この Texas-Red を取り込んだ細胞は、常在型マクロファージの選択的抗体である ED-2 抗体を認識したことから、常在型マクロファージであることが確認された。単離された常在型マクロファージは培養時間に伴い (1~5 日)、形態を変化させた。この形態変化に伴い静止膜電位は徐々に深くなり、また膜容量は時間とともに増大した。各培養日数におけるマクロファージを用い、細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化を測定したところ、4 日目以降のマクロファージで ATP (10 μ M), PAF (0.3 μ M) または LPS (10 ng/ml) の全てに対して高い反応性を示し、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ の増加を示した。一方、これらの作動薬による $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、PKC 活性化薬 phorbol 12, 13-dibutyrate (1 μ M) または adenylate cyclase 活性化薬 forskolin (1 μ M) の前処置により抑制された。【考察】消化管の常在型マクロファージは、単離後も LPS に対する感受性を維持すること、またプリン受容体および PAF 受容体も存在することが確認された。さらに、少なくとも PKC ならびに A-kinase を介する経路が存在し、これらは各種刺激薬による $[Ca^{2+}]_i$ 増加に対し抑制的に働くことが明らかとなった。

67. フェレットを用いた意識下における消化管運動測定モデルに関する検討

東京慈恵会医科大学外科, 同解剖第1¹

川崎 成郎, 中田 浩二, 羽生 信義, 中尾 誠利¹, 古川 良幸, 向井 英晴
山本 尚, 梁井真一郎, 山下 廣¹, 青木 照明

【目的】近年, 意識下における消化管運動研究の実験モデルとしてイヌが使いにくい状況となりつつあり, 小動物を用いた実験モデルに対する需要が高まりつつある。しかし, ラットの消化管運動はヒトや犬と異なることが問題とされる。今回われわれはフェレットを用い, 意識下における消化管運動の測定を行い, 犬の代替モデルとなりうるかどうかについて検討した。

【方法】フェレット(体重1.0-1.3 kg)をイソフルレンの吸入麻酔下に腹部正中切開にて開腹した。ストレンジャートランスデューサー(スターメディカル社製)を胃幽門洞部(F-08IS, 8.0×5.0 mm), 十二指腸および空腸(F-06IS, 6.0×4.0 mm)の漿膜面に4-0絹糸を用い, 輪状筋の収縮運動が記録できる方向に縫着した。意識下に空腹期および食後期の消化管運動の測定を行ない検討した。

【結果】空腹期においては, 胃, 十二指腸に周期的に出現する強収縮が空腸に伝播する空腹期パターンが観察され, その周期は平均約60分であった。食後期には, 不規則な小収縮波群が持続する食後期パターンが観察された。フェレットにおいて観察された消化管運動様式はヒト, およびイヌの消化管運動様式に類似した。

【結語】フェレットの意識下における消化管運動の測定は既存の測定器械を用いることにより可能であり, その運動様式がヒトおよびイヌに類似することから, 従来行なわれてきたイヌを用いた実験モデルに代替しうると考えられた。

68. ウサギ下部尿路組織の電気刺激誘発弛緩に対するV型PDE阻害薬の作用

協和発酵工業株式会社医薬総合研究所

吉松亜紀子, 井出 慎一, 奥村 浩, 廣瀬 了, 市村 通朗, 白倉 史郎

【目的】尿道, 前立腺および海綿体などの下部尿路組織では電気刺激によりNO神経を介する弛緩反応が観察される。このうち海綿体の弛緩反応に対するcGMP特異的分解酵素(V型PDE)阻害薬の増強作用については知られているが, 尿道, 前立腺における作用を詳しく調べた報告はない。今回, ウサギ摘出尿道, 前立腺および海綿体のNO神経を介した弛緩に対するV型PDE阻害薬KF31327(IC₅₀: 0.074 nM)とsildenafilの作用を検討した。【方法】雄性ウサギから摘出した尿道, 前立腺および海綿体標本をorgan bath中に懸垂し, 張力変化を等尺性トランスジューサーにて記録した。L-phenylephrineまたはnorepinephrineにより標本を収縮させた状態で経壁電気刺激(EFS)を行い, 弛緩反応を観察した。【結果】尿道, 前立腺および海綿体においてEFSにより頻度依存的な一過性の弛緩反応が観察された。tetrodotoxinとNO合成酵素阻害剤であるL-NAMEは全ての頻度においてEFS誘発弛緩を抑制した。尿道および前立腺においてKF31327とsildenafilはEFS誘発弛緩の最大反応に対し影響しなかったが, 弛緩の持続時間を有意に延長させた。一方, 海綿体において両薬物は, EFS誘発弛緩の最大反応と持続時間を有意に増強した。【結論】今回, V型PDE阻害薬が海綿体のみならず尿道と前立腺においてもNO神経を介する弛緩反応を増強することを明らかにした。ヒト排尿時の尿道弛緩にNO神経が関与していると考えられていることから, V型PDE阻害薬は排尿時の尿道弛緩を増強するだけでなく, 前立腺をも弛緩させることにより, 前立腺肥大時の排尿障害を改善する可能性が考えられた。

69. NO 神経依存的なラット尿道弛緩反応に対する V 型 PDE 阻害薬の作用

協和発酵工業株式会社医薬総合研究所

井出 慎一, 廣瀬 了, 市村 通朗, 白倉 史郎

【目的】近年, 尿道弛緩に NO 神経が関与していること, また NO 神経を介した弛緩が cGMP 分解酵素阻害薬により増強されることが報告されている。cGMP 特異的分解酵素(V 型 PDE)に選択的で, 高い阻害活性を有する KF31327 (IC_{50} : 0.074 nM) や既存の V 型 PDE 阻害薬 sildenafil は, NO 神経を介した尿道弛緩反応を増強する可能性が考えられる。そこで, 1) 神経節刺激薬 1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide (DMPP) を静脈内投与した時に観察される尿道灌流圧 (UPP) 低下反応, 2) 摘出尿道標本を経壁電気刺激 (EFS) した時に観察される弛緩反応に対する KF31327 および sildenafil の作用を検討した。【方法】1) ウレタン麻酔下に雌ラットの尿道にカニューレを挿入し, 生理食塩液を灌流しながら UPP の変化を圧トランスジューサーにて記録した。2) 雌ラットから得た尿道平滑筋標本を organ bath 中に懸垂し, 張力変化を等尺性トランスジューサーにて記録した。10 μ M の noradrenalin で尿道標本を前収縮させ, EFS による弛緩反応を観察した。【結果】1) DMPP (100 μ g/kg) により UPP は低下し, それは NO 合成酵素阻害剤の L-NAME により抑制された。KF31327 (1~100 μ g/kg, i.v.) および sildenafil (10~1,000 μ g/kg, i.v.) は, DMPP による UPP の最大低下反応には影響せずに, UPP 低下の持続時間を延長させた。2) EFS は, 尿道標本を頻度依存的に弛緩させ, この反応は L-NAME で抑制された。KF31327 および sildenafil (各 100 nM) は, EFS による最大弛緩反応にはほとんど影響せずに, 弛緩の持続時間を延長させた。【結論】ラット尿道弛緩反応には NO 神経が関与し, V 型 PDE 阻害薬は cGMP の分解を抑制することで NO/cGMP pathway を介した尿道弛緩反応の持続を延長させると推察された。

70. ラット膀胱平滑筋からのアセチルコリン放出に及ぼすプロスタグランジン E_2 の影響

熊本大学医学部泌尿器科

稲留 彰人, 吉田 正貴, 米納 誠, 瀬下 博志, 宮本 豊, 村上 滋孝
岩下 仁, 大谷 将之, 宮前 公一, 上田 昭一

【目的】膀胱平滑筋機能におけるプロスタグランジン(PG)の役割は不明な点が多い。これまで我々は膀胱平滑筋からの神経伝達物質の放出における prejunctional receptor の影響について microdialysis 法を用いて検討してきたが, 今回ラット膀胱平滑筋からのアセチルコリン (ACh) 放出に対する PGE_2 の影響について検討した。

【方法】雌性ラット膀胱より作製した平滑筋条片に臓器用透析プローブを貫通させ, organ bath 内に懸垂固定し, 等尺性トランスジューサーを介して張力変化を記録しながらリング液を灌流させ透析液を回収した。回収した透析液は高速液体クロマトグラフィーにて ACh 放出量を測定した。インドメタシン 10 μ M を前処置したのち, 経壁電気刺激を行い, PGE_2 の投与前後での収縮反応, ACh 放出量を比較検討した。

【結果】インドメタシンの前処置により自発性律動収縮は減少し, 経壁電気刺激によるラット膀胱平滑筋条片の収縮反応, ACh 放出量は有意に増加した。 PGE_2 (1 μ M) の前処置により, 自発性律動収縮の増加とともに軽度の収縮反応を示したが, 電気刺激前の ACh 放出量には有意な差は認められなかった。しかし, 電気刺激時の収縮反応および ACh 放出量は有意に抑制された。

【結論】ラット膀胱平滑筋において, PGE_2 により経壁電気刺激時の ACh 放出量を抑制する機構が存在する可能性が示唆された。

71. 摘出ヒト膀胱平滑筋に対する Darifenacin Hydrobromide の作用

熊本大学医学部泌尿器科

宮前 公一, 吉田 正貴, 宮本 豊, 村上 滋孝, 大谷 将之, 岩下 仁
 枅永 浩一, 上田 昭一

【目的】頻尿・尿失禁治療薬として開発された Darifenacin Hydrobromide (darifenacin) は、ムスカリン M3 受容体に高親和性を示し、動物実験では膀胱に対する選択性が認められているが、ヒト膀胱に対する作用を検討した報告はみられない。今回我々はヒト膀胱平滑筋に対する薬理学特性について検討した。【方法】膀胱腫瘍にて膀胱全摘術を受けた患者の膀胱から平滑筋条片を作成し、これを 37°C で酸素化した Krebs-Henseleit 液を満たした筋浴槽内に懸垂固定し、Carbachol (CCh), 80 mM KCl, 5 mM CaCl₂ および経壁電気刺激収縮 (EFS) に対する darifenacin の作用を等尺性トランスデューサーを介して記録した。【結果】CCh (10⁻⁸-10⁻² M) は膀胱平滑筋を用量依存性に収縮させた。darifenacin (10⁻¹⁰-10⁻⁷ M) の前処置により、CCh の用量反応曲線は右方に移動したが、高濃度の前処置でも最大収縮はほとんど抑制されなかった。また 80 mM KCl および 5 mM CaCl₂ による収縮に対してはほとんど影響を示さなかった。EFS (パルス幅 0.3 msec, 周波数 2-60 Hz) による周波数反応曲線に対しては、darifenacin は用量依存性に収縮を抑制した。また atropine 10⁻⁶ M 存在下で EFS による atropine 抵抗性収縮に対して darifenacin は抑制作用を示さなかった。【結論】Darifenacin はヒト膀胱平滑筋に対して主に抗ムスカリン作用により収縮反応を抑制することが示され、頻尿・尿失禁治療薬として有用である可能性が示唆された。

72. ブタ尿道平滑筋におけるスルフォニルウレア受容体サブタイプの同定

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

柚木 貴和, 寺本 憲功, 伊東 祐之

近年 ATP 感受性 K⁺ チャネル (K_{ATP} チャネル) は、少なくとも 2 種類の非依存的な蛋白質、すなわちスルフォニルウレア受容体 (SUR) と内向き整流性 K⁺ チャネル (Kir) で構成され各々のサブタイプの組み合わせは臓器によって異なることが明らかとなった。今回我々は、SUR 蛋白サブタイプによってその活性化作用が異なる新規 K_{ATP} チャネル開口薬 MCC-134 を用いブタ尿道平滑筋の K⁺ 膜電流に及ぼす薬理学的作用を検討しさらに RT-PCR 法を用いてブタ尿道平滑筋の SUR 蛋白の mRNA 発現を検討した。

ブタ尿道平滑筋切片を垂直懸垂固定し MCC-134 を累積投与すると濃度依存的な弛緩反応が惹起し (EC₅₀ = 6 μM) グリベンクラミド (1 μM) 追加投与によりその弛緩は完全に抑制した。ホールセル電位固定法下 (保持電位 -50 mV, 140 mM K⁺ symmetrical conditions) で MCC-134 100 μM 投与を投与するとグリベンクラミド感受性内向き整流性電流が惹起しこの K⁺ 電流の最大振幅値は、Pinacidil (100 μM) 誘発性 K⁺ 電流の最大振幅の約 50% であった。Pinacidil 投与により惹起された内向き K⁺ 電流に対し MCC-134 (100 μM) を追加投与すると有為な約 10% の抑制が観察された。シングルチャネル記録法で MCC-134 (100 μM) を投与すると約 42 pS の内向き整流性グリベンクラミド感受性 K⁺ チャネルが活性化され RT-PCR 法を用いた解析では SUR2B の mRNA の発現が観察された。以上よりブタ尿道平滑筋の SUR 蛋白サブタイプは主に SUR2B である可能性が示唆された。

73. ジヒドロピリジン受容体アゴニストと脱分極の相互作用によって発現する平滑筋 Ca チャネルの複数の開口状態に関する分子機序

名古屋大学大学院医学研究科細胞生理, 同機能調節内科¹,
東北大学大学院医学研究科分子薬理², Oxford 大学薬理³

中山 晋介, 青山 昌広¹, 伊藤 康¹, 山木 健一¹, 村上 学²
Lorraine M. Smith³, Alison F. Brading³

平滑筋組織は生体各所に存在し, その機能に応じて様々な収縮様式を持つ。例えば, 腸管平滑筋は相性の収縮を繰り返し, また, 血管平滑筋は持続的収縮により血圧を維持する。興奮性細胞である平滑筋には, 一般的に電位依存性 Ca チャネルが存在し, 細胞膜の脱分極により活性化されて, 細胞内への Ca 流入を引き起こす。平滑筋に存在する電位依存性 Ca チャネルは, 種差・組織におけるばらつきはあるものの, 主にジヒドロピリジン感受性の L 型 Ca チャネルであることが知られている。つまり, 生体各組織・臓器の多様な生理機能に, この L 型 Ca チャネルが対処することとなる。私たちは単離平滑筋細胞において, 通常脱分極による正常開口状態 (O1) と比較的高脱分極によって引き起こされる第二の開口状態 (O2) の存在を報告した。Ca チャネルが O2 状態にあると脱分極中でも不活性化せず, また再分極時には脱活性化が遅延して Ca 流入の増大を来す。一方, ジヒドロピリジン Ca アゴニストはこの脱分極とは別の機構によって, Ca チャネルの長期開口を引き起こす。従って, Ca アゴニスト結合状態での正常開口状態 (O1*) と第二の開口状態 (O2*) が存在する。最近, 平滑筋 L 型 Ca チャネルの $\alpha 1$ サブユニット (Cav1.2b) のみを発現させた培養細胞 (CHOCa9) を用いて Ca 電流の解析を行ったところ, ジヒドロピリジン Ca アゴニストと脱分極によって引き起こされる複数の開口状態 (少なくとも 4 種) はすべて $\alpha 1$ サブユニットに保存されることがわかった。このことから, 第二の開口状態はチャネル蛋白内ボルテージセンサーの電位依存的修飾作用に起因することが考察された。Ca チャネル脱活性化速度の解析から, ジヒドロピリジン Ca アントゴニスト (拮抗薬) の作用は, $\alpha 1$ サブユニット内の異なるアミノ酸残基を介することが示唆された。また, β サブユニットは, Ca チャネルの第二の開口状態への遷移を修飾する可能性が示唆された。

74. イソプレノイド誘導体を用いた L 型 Ca チャネルにおけるカルモジュリンの機能解析

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理

堀 正敏, 佐藤 晃一, 尾崎 博, 唐木 英明

【目的】L 型 Ca チャネルの α_{1C} サブユニットは, その C 末端細胞内ドメインに Ca 非依存性カルモジュリン (CaM) 結合部位である共通アミノ酸配列 (IQ モチーフ) を持つが, 最近この L 型 Ca チャネルの活性が CaM により制御されている可能性を指摘する報告があいついでいる。一方, コレステロール生合成系 (メバロン酸代謝) の中間産物として生合成されるイソプレノイド化合物ファルネソール (FNS) は, L 型 Ca チャネルを阻害することが報告されている。我々は, 海綿由来の天然毒ステレタマイド-A (ST-A) がカルモジュリン阻害作用を持つことを見いだしたが, この物質はファルネシル基を化学構造として持っている。本研究では, ST-A と FNS の CaM に対する作用と L 型 Ca チャネルに対する作用を比較することにより, L 型 Ca チャネルにおける CaM の役割について検討した。【結果】ホスホジエステラーゼ活性と MLCK 活性を指標とした CaM 活性において, ST-A は濃度依存性に CaM 活性を抑制した。しかし, FNS は CaM 活性に影響しなかった。モルモット回腸単離平滑筋細胞の電気生理学的解析において, ST-A と FNS は, ともに電位依存性の内向き Ba 電流を抑制した。パッチ電極内に $1 \mu\text{M}$ の CaM を添加すると, ST-A による Ba 電流の抑制作用は約 50% 回復したが, FNS による Ba 電流の抑制作用は回復しなかった。また, パッチピペット内に 10 mM EGTA を加えた状態においても, ST-A による Ba 電流の抑制作用は 0.05 mM EGTA の場合と同等であった。【考察】① FNS は CaM 阻害作用を持たず, L 型 Ca チャネルを直接抑制する作用を持つ。② ST-A による平滑筋 L 型 Ca チャネル抑制作用は, FNS 同様のチャネル直接作用と, CaM を介した作用による。③ 平滑筋 L 型 Ca チャネルに対する CaM の抑制作用は, Ca 非依存性であり, CaM 分子が直接的に機能している可能性が示唆された。

75. 電位依存性 Ca^{2+} チャネル $\beta 3$ サブユニット欠損マウスの膀胱単離平滑筋における電流解析およびジヒドロピリジン結合解析

東北大学大学院医学研究科分子薬理, 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学¹

村上 学, 山村 寿男¹, 布木 和夫, 村木 克彦¹, 柳澤 輝行, 今泉 祐治¹

平滑筋細胞において, 電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) の発現密度は細胞膜興奮性を決定する最も重要な因子である。VDCC はチャネル小孔を形成する $\alpha 1$ とその機能を修飾する $\alpha 2/\delta, \beta$, (一部の組織では) γ サブユニットによって構成されている。中でも, β サブユニットは興奮収縮連関の制御, 電流量の決定, 活性化・不活性化の調節, 発現レベルの促進など多様な機能的調節に関与する。現在までに, 4 種類の β サブユニット遺伝子 ($\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$) が同定され, 骨格筋には $\beta 1$, 心筋や平滑筋には $\beta 2$ と $\beta 3$ が強く発現し, 脳・神経系には 4 種類が豊富に存在する。 $\beta 3$ サブユニット欠損マウスの神経細胞において, N 型と L 型 Ca^{2+} チャネル電流の減少や P/Q 型 Ca^{2+} チャネルの電位依存的な活性化が報告されている。しかしながら, 平滑筋細胞における β サブユニットの機能は, あまり検討されていない。そこで本研究では, $\beta 3$ サブユニット欠損マウス ($\beta 3^{-/-}$) を用いて, 平滑筋細胞において $\beta 3$ サブユニットが VDCC の制御に果たす生理学的・薬理学的役割について検討した。酵素処理により得た膀胱単離平滑筋細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し, 100 nM Cd^{2+} 感受性の VDCC 電流を記録した。保持電位 -60 mV から 150 ms 間脱分極させたときの Ca^{2+} 電流密度は, 野生型マウス (wt) ならびに $\beta 3^{-/-}$ の両者とも 0 mV で最大値に達したが, $\beta 3^{-/-}$ の電流密度は wt の約 50% に減少していた。さらに, steady-state inactivation を検討したところ, $\beta 3^{-/-}$ の不活性化曲線は, wt のそれよりも約 5 mV 脱分極側に移動していた。ジヒドロピリジン系薬物 (Bay K 8644 とニカルジピン) に対する感受性は変化していなかった。また, ジヒドロピリジン結合実験より, $\beta 3^{-/-}$ の VDCC 数が約 50% に減少していることが判明した。以上の結果は, マウス膀胱平滑筋細胞において, $\beta 3$ サブユニットは電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの発現調節と不活性化機構に寄与していること強く示唆している。

76. HEK293 細胞に発現させた腸管平滑筋由来の BK_{Ca} チャネルに対する Epoxyeicosatrienoic acid の作用に関する検討

北海道大学大学院医学研究科情報薬理学講座細胞薬理

深尾 充宏, 三輪 聡一

Epoxyeicosatrienoic acid (EET) はチトクローム P450 によるアラキドン酸の代謝産物である。EET は血管内皮細胞より産生されて血管平滑筋細胞に作用し弛緩反応を引き起こす。その作用機序としては, EET が血管平滑筋に存在する Ca^{2+} 活性化 K^{+} チャネル (BK_{Ca}) を活性化し, 膜電位を過分極させることによると考えられている。 BK_{Ca} チャネルは α -および β -subunit より構成されるが, EET がどちらの subunit に作用するのかわからない。本研究では, 犬腸管平滑筋よりクローニングした BK_{Ca} チャネルの α -subunit を HEK 細胞に発現させて, EET の作用を patch clamp 法により検討した。Whole cell patch で 11, 12-EET は BK_{Ca} 電流を約 2 倍増加させた。また, cell-attached patch でも, 11, 12-EET は濃度依存性に BK_{Ca} チャネルを活性化した。この際, single channel conductance (約 280 pS) の変化は認められなかった。Inside-out patch では, 11, 12-EET は, 細胞質側に GTP が存在する時のみ BK_{Ca} チャネルを活性化した。 BK_{Ca} チャネルの活性化は, *Gas* の抗体により抑制されたが, *Gai/o* や *G $\beta\gamma$* の抗体では抑制されなかった。*Gas* を活性化させる cholera toxin は BK_{Ca} チャネルを活性化したが, この状態にさらに 11, 12-EET を投与しても BK_{Ca} チャネルのさらなる活性化は認められなかった。Protein kinase A の阻害薬である KT5720 は forskolin による BK_{Ca} チャネルの活性化は抑制したが, 11, 12-EET による BK_{Ca} チャネルの活性化は抑制しなかった。ADP-ribosyltransferase を抑制する 3-AB と MIBG は 11, 12-EET による BK_{Ca} チャネルの活性化を抑制した。以上の結果より, 11, 12-EET は, HEK 細胞に発現させた BK_{Ca} チャネルの α -subunit を β -subunit 非存在下でも活性化することが判明した。また, 11, 12-EET が BK_{Ca} チャネルを活性化する作用機序としては, *Gas* の ADP-ribosyl 化による活性化が関与することが推定された。この際, protein kinase A の関与は否定的であった。

77. モルモット回腸平滑筋細胞における ATP 感受性 K チャネル活性の調節機構

岐阜大学農学部獣医学科家畜養理

海野 年弘, 小森 成一

ATP 感受性 K (KATP) チャネルは, 血管をはじめとした多くの平滑筋種に存在することが知られている。しかし, 血管以外の組織では同チャネル活性がどのような調節を受けるのか明らかにされていない。本研究ではこの点を明らかにする一環として, 腸管平滑筋細胞における KATP チャネル活性に及ぼす細胞内ヌクレオチドの影響について検討した。実験にはモルモット回腸縦走筋の単一細胞を用い, パッチクランプ法により膜電流反応を記録した。細胞外液には 60 mM KCl 溶液を, 細胞内液には 140 mM KCl 溶液を使用した。【結果】(1) ホールセルパッチクランプ下 (保持電位: -80 mV) において, クロマカリム (Crom) は濃度依存性に内向き電流を誘発した (EC₅₀: 3.4 μ M)。Crom によって誘発された内向き電流はグリベンクラミド (Glyb) により抑制された。(2) 細胞内液に ADP, AMP, GDP あるいは GMP (1 mM) を添加すると自発性の内向き電流が誘発され, Glyb を適用するとこの電流は消失した。内向き電流の誘発効力は GDP > ADP > AMP = GMP の順であった。ATP または GTP を添加した場合, あるいは細胞内液をヌクレオチドフリーにした場合には内向き電流は誘発されなかった。(3) インサイド-アウトパッチ (保持電位: -60 mV) の状態で Crom を適用すると, Glyb 感受性の単一チャネル電流が誘発され, そのコンダクタンスは 38 pS であった。(4) 細胞内側の ATP を除去してもチャネル活動は観察されなかった。しかし, GDP あるいは ADP を細胞内側へ適用すると Crom の場合と同様のコンダクタンスを持つ単一チャネル電流が誘発され, さらに Crom を適用するとチャネルの開閉確率は著しく増加した。以上の成績から, 腸管平滑筋における KATP チャネルは, 細胞内における ATP 濃度の低下よりむしろヌクレオチド二リン酸濃度の増加により開口することが示唆された。現在, KATP チャネル活性に対する薬物受容体刺激効果について検討しており, この結果も合わせて報告する。

78. ウシ毛様体平滑筋の持続的収縮時における Ca²⁺ 流入経路としてのムスカリン作動性陽イオンチャネル

名古屋大学大学院医学研究科細胞科学講座分子動態学, 同医学部眼科

高井 章, 高井 佳子¹, 三宅 養三¹

【目的】(1) 毛様体平滑筋に存在しムスカリン M₃ 受容体刺激により開口するある種の非選択性陽イオンチャネル (NSCC) が Ca²⁺ 流入経路として機能する可能性を検討する。(2) ムスカリン受容体経路で調節される NSCC を形成することで知られる *trp* 遺伝子の発現を RT-PCR 法により調べる。

【方法】単離ウシ毛様体筋細胞において全細胞膜電位固定法により電流を記録。灌流液には HEPES-Krebs 液 (pH 7.4) を使用。電極は K⁺ を含まず, 100 mM Cs aspartate, 5 mM-BAPTA ([Ca²⁺]=70 nM) と 200 μ M-GTP (pH 7.0) を含む液で満たした。収縮記録には等尺性張力変換装置を使用。実験は全て 30°C で行った。RT-PCR 用のプライマは, ヒトまたはマウス *trp* (*trp1-trp7*) 遺伝子の既知塩基配列をもとに, チャネル孔形成部とされる 100-130 アミノ酸に対応する部位を挟むように設計。

【結果と考察】膜電位を -50 mV に保持し CCh (2 μ M) を灌流液中に投与すると, 内向き電流が観察された。電流ノイズの解析により, この応答が単位コンダクタンスが大きく異なる (35 pS と 100 fS) 2 種類の NSCC (NSCC_L と NSCC_S) の開口によることが示唆された。灌流液陽イオンの全置換実験から, NSCC_L は一価陽イオン (Li⁺, Na⁺, K⁺, Cs⁺) のみを, 一方 NSCC_S は一価のみならず二価陽イオン (Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺) をも通すことが分かった。NSCC_S は 10-100 μ M の La³⁺, Gd³⁺ または SKF96365 の灌流液投与により可逆的に抑制された。これらの薬剤はいずれも CCh 投与に伴う毛様体筋収縮の初期相には大きな影響を与えることなく持続相のみを強く抑制した。電位依存性 Ca²⁺ チャネルがほとんど発現していない毛様体平滑筋においては NSCC_S が収縮持続相に必要な細胞外からの Ca²⁺ 流入経路となる可能性がある。一方, RT-PCR 法による cDNA の検索により, ヒト *trp3* および *trp6* に相当する *trp* が多く発現していることが明らかになった。

79. 再構成平滑筋微細形質膜の G 蛋白質活性化陽イオンチャネルの性質

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

土井良順子, 尾上 均, 伊東 祐之, 井上 隆司

モルモット回腸縦走筋から蔗糖密度勾配超遠心分離法によって精製した平滑筋微細形質膜を人工脂質二重膜に再構成し, G 蛋白質共役型受容体刺激によって活性化される Ca^{2+} 透過型陽イオンチャネル (ROCCs) 活性を記録した. 25/30% の蔗糖密度勾配界面から, 最も高い蛋白含量を示す微細形質膜の画分が得られた. この画分を先端を細くしたガラス棒を用いて人工脂質膜 (組成; PE:PS:PC=12.5:5.0:7.5) に直接導入すると, 形質膜に豊富に存在する Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが高い頻度 (約 70%) で検出された. この時, 再構成された K^+ チャネルの電位依存性から判断すると, 殆どの微細形質膜胞は inside-out であることが分かった. 次に再構成された微細形質膜の内外を Na^+ イオンに置換し, 細胞質側に $\text{GTP}\gamma\text{S}$ (100 μM) を加えると, 約百 nM 以上の Ca^{2+} を必要とし, 膜脱分極によって活性が増加する性質を示すイオンチャネル活性が比較的高い頻度で検出された (約 20%). このチャネルは細胞質側に $\text{GDP}\beta\text{S}$ (1 mM) を予め添加しておくことと活性化が阻害され, その逆転電位および単一チャネルコンダクタンスは細胞外 Na^+ 濃度減少によって, それぞれ左方移動, 減少を示した. 以上の性質は, 同じ組織から記録されるムスカリン受容体作動性陽イオン電流の性質とほぼ完全に一致した. これらの結果から, 本研究で確立された方法が, 平滑筋の ROCCs の性質を単一チャネルレベルで検討するのに, 極めて有用である事が明らかになった.