

招待講演

Electrophysiology of the Stomach : Diagnosis and Treatment

Division of Gastroenterology, University of Texas Medical Branch

Jiande Chen, PhD

Gastric myoelectrical activity consists of slow waves and spikes. The gastric slow wave originates in the corpus and propagates distally towards the pylorus. Recent electrophysiological studies have suggested that interstitial cells of Cajal (ICC) are responsible for the generation and propagation of the slow wave. The frequency of the gastric slow wave is 3 cycles/min (cpm) in humans and about 5 cpm in dogs. In abnormal cases the gastric slow wave may have a frequency too high (tachygastric) or too low (bradygastric). Gastric dysrhythmia is a term standing for various abnormalities in slow wave rhythmicity, including tachygastric, bradygastric and arrhythmia (no dominant rhythmicity). Gastric dysrhythmia is often observed in patients with gastric motility disorders.

This lecture will be composed of 3 portions : 1) Origin of gastric slow waves ; 2) Pros and cons of electrogastric ; 3) Gastric electrical stimulation for the treatment of gastroparesis and obesity.

1. *Origin of gastric slow waves* : An update will be given on the role of ICC and enteric nervous system. Modulational role of cephalic and vagal inputs will also be discussed.
2. *Pros and cons of electrogastric (EGG)* : The presentation will be focused on the principles and applications of the EGG, pros and cons of the existing commercial devices and new development in the field of EGG.
3. *Gastric electrical stimulation* :
 - a. Gastric electrical stimulation for gastroparesis : Various methods of gastric electrical stimulation will first be introduced. Laboratory and clinical research data will be updated. Possible mechanisms of gastric electrical stimulation will be discussed.
 - b. Gastric electrical stimulation for obesity : After a brief introduction of epidemic problems of obesity, the basis for the treatment of obesity using gastric electrical stimulation will be introduced. Preliminary research and clinical data will be presented and possible mechanisms of gastric electrical stimulation for the treatment of obesity will be discussed.

特別講演

消化管運動の制御

東京大学・農・生命科学研究科

唐 木 英 明

要約 消化管運動は多くの生理学的・病態生理学的研究の対象となってきた。興味を中心は消化管平滑筋興奮のメカニズムと、多くの平滑筋の興奮を同調・制御するメカニズムに大別され、後者は局所における制御と中枢による制御に二分される。中枢研究の発展とともに、「食欲」と「性欲」のような本能の対立関係のメカニズムが解明され、感情やストレスのような中枢機能が消化管機能を制御する「脳-腸連関」の研究も大きく進んだ。局所では Cajal 介在細胞が平滑筋細胞と自律神経細胞のクロストークの仲立ちをすることが明らかにされ、さらに消化管 Auerbach 神経叢と漿膜面に分布する常在型マクロファージが消化管収縮制御に関与する可能性も指摘され、その解明が進んでいる。

はじめに

「パプロフの犬」で知られるように、大脳辺縁系が摂食中枢を介して食欲を制御し、自律神経系を介して消化管運動を制御する「脳・腸連関」、そして中枢の情報が自律神経系および内分泌系を介して免疫系を制御する「脳・免疫連関」も明らかにされ、「脳・腸・免疫トライアングル」も解明されつつある。身体内外の情報は中枢を介して、あるいは消化管に直接伝えられてその運動を制御するが、以下、消化管局所における平滑筋細胞とその制御にかかわる細胞のクロストークについて概説する。

「神経・腸連関」とカハール介在細胞

局所において消化管運動を制御する因子の一つが Interstitial cells of Cajal (ICC) である。ICC は消化管の Auerbach 神経叢にある、c-Kit タンパク質をもつ細胞である。また、ICC と平滑筋は gap junction により連絡する。ICC を持たない W/W^v ミュータント・マウスの消化管では、個々の平滑筋細胞の運動は変わらないが、消化管蠕動の「波」は消える¹⁾。すなわち、ICC は消化管運動のペースメーカーとして働く。さらに、ICC は副交感神経および NO 神経の情報を受け取り、これを平滑筋に伝達する働きと、消化管の機械的刺激情報を神経に伝達する働きをもつと考えられる。

局所における「免疫・腸連関」

Auerbach 神経叢を詳細に観察すると、基盤の目のように配置する神経叢の間に ICC と常在型 $m\phi$ が規則的に分布する。これが 1985 年に Mikkelsen らによって発見された「常在型マクロファージ」($m\phi$) である²⁾。消化管の免疫機能は粘膜系が担っているが、筋層間に $m\phi$ が存在することは、筋層自身もまた免疫に関係している可能性を示す。この常在型 $m\phi$ の役割を検討するために我々はラット回腸培養標本に LPS を投与したところ、30 分後から組織中の COX-2 mRNA が増え始め、90 分後には最大値に達した。他方、iNOS mRNA は LPS 投与 90 分後か

ら増え始め、120分後に最大値に達した³⁻⁵⁾。iNOS および COX-2 の免疫組織染色と、常在型 m ϕ マーカーである ED2 を用いた免疫染色の二重染色を行ったところ、両者は一致した。さらに iNOS mRNA の増加と一致して NO 産生が増加し、COX2 mRNA の増加と一致して PGE2 と PGI2 の産生が増加した。COX-2 を抑制して LPS を投与したところ iNOS 発現が抑制されたが、iNOS を抑制して LPS を投与しても COX-2 の発現は影響を受けなかった。一方、LPS 存在下で培養した消化管の収縮は抑制される。iNOS 抑制下で収縮は約半分回復し、COX-2 抑制下では収縮はほぼ完全に回復した。これらの成績から、LPS による消化管収縮の抑制は常在型 m ϕ 内の COX-2 の誘導、PG 産生、PG による平滑筋収縮抑制という経路と、PG による常在型 m ϕ 内の iNOS 誘導、NO 産生、NO による平滑筋収縮抑制という経路の 2 種類があることが示唆された。これらの成績は、さらに、消化管の炎症が常在型 m ϕ を介して平滑筋収縮、すなわち消化管運動機能に大きな影響を及ぼすことを示唆している。

病態消化管の「免疫・腸関連」

炎症性腸炎と消化管運動との関係、とりわけ免疫系細胞と平滑筋の相互作用に我々は興味を持ち、2つの腸炎モデル系での検討を行っている。自然発症エンドセリン ETB 受容体欠損ラットは直腸から小腸の下部にかけて神経叢が欠損しているために蠕動運動が起こらずに、ヒルシュスプラング病と類似した症状を呈する。ETB 受容体欠損はヒト、マウス、ウマでも起こる。そして、生後 10 日から 2 週間の ETB 受容体欠損ラット腸の炎症部分では、m ϕ の数が約 3 倍に増加していた⁵⁾。また、炎症部位の平滑筋の収縮力は、正常部位に比べてむしろ増加していた。さらに平滑筋細胞層の数が増加し筋層の肥厚も観察された⁶⁾。ハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) で惹起された腸炎の場合も筋層間常在型 m ϕ の増加が見られ、細胞容積の増大も観察された。そして平滑筋の収縮性は顕著に低下していた。すなわち、腸炎でも筋層の機能的変化の状況は様々である。

文 献

- 1) Ward, S.M. and Sanders, K.M.: Anat. Rec. 262: 125-135, 2001
- 2) Mikkelsen, H.B. et al.: Anat. Rec. 213: 77-86, 1985
- 3) Torihashi, S. et al.: Acta. Histochem. Cytochem. 34: 219-222, 2001
- 4) Hori, M. et al.: Am. J. Physiol. 280: G930-G938, 2001
- 5) Torihashi, S. et al.: Histochem. Cell Biol. 113: 73-80, 2000
- 6) Won, K. J. et al.: Gut 50: 355-360, 2002

教育講演

カハールの介在細胞 (interstitial cells of Cajal) の構造と機能

名古屋大学・医・機能形態学分子細胞学

鳥橋茂子

Interstitial cells of Cajal (ICC) は真に神経解剖学者カハールが見出した細胞であるかどうか異論を唱える者もいるが、現在消化管平滑筋層には神経と隣接する固有の細胞が存在しこれが平滑筋細胞に大きな作用を与える事は一般に受け入れられるようになった。従って100年も前に消化管には神経と平滑筋の間に介在する細胞があるという概念を提示し、ここに研究者の注目を惹起したカハールの業績は大きい。これをもってカハールの介在細胞 (ICC) と称する意味があると考え。本講演では ICC の基本的な特徴等について以下の項目について紹介する。

1) c-Kit の発現

前田ら (1992 年) はレセプター型チロシンキナーゼ c-Kit の機能阻害が消化管運動ペースメーカー機構に異常を生じると報告した。これはその後続く c-Kit 発現細胞が ICC であるという証明と ICC がペースメーカー細胞である事を示唆する一連の報告の発端であった。c-Kit をマーカーとした ICC の同定と機能解析はこの分野の研究を飛躍的に発展させた事は周知の通りであるが今のところ c-Kit シグナル系が直接 ICC のペースメーカー機能に関与しているという報告はない。

2) 微細構造上の特徴

ICC はいくつかの特徴的な微細形態を示す。ミトコンドリアや細胞膜の窪みであるカベオラそして滑面小胞体が多く、一般的には細胞内の電子密度が高く電子顕微鏡下では暗調の細胞である。ICC 同志また平滑筋との間にネクサスを形成し電気的に結合している。これらの特徴は ICC の機能に密接に結びついている。しかし、ICC は存在部位による違いや種差も多く平滑筋に近い特徴と線維芽細胞に似た形態を併せ持つ独立した細胞系であると考えられる。

3) 発生学的特徴

c-Kit の発現を指標として ICC の発生をたどると、マウスの小腸では平滑筋も ICC も共に c-Kit を発現する間葉系細胞に由来する。そして神経冠細胞から分化する壁内神経とは異なる起源を持つ。やがて胎生後期に ICC と平滑筋は独立した細胞系へと分化し、それぞれの機能を示すようになる。

4) 可塑性

発生学的には上述のように ICC と平滑筋は共に共通の起源を持ち細胞系譜上は近い関係にある。分化途上の ICC に対し実験的に c-Kit の発現を阻害したところ、この細胞は平滑筋様細胞へと形質転換した。平滑筋も ICC も発生過程で共に c-kit を発現する時期があるが、平滑筋は c-Kit 非依存性に分化する。そして ICC のみが分化増殖に c-Kit シグナル系を必要とするらしい。

5) ICC の機能

現在の所、機能的には異なる少なくとも二種類の ICC のサブグループが存在すると考えられている。一つは平滑筋の律動的自動運動のペースメーカーである。そして他方は神経の平滑筋に対する神経伝達を調整するグループである。このグループの ICC は神経伝達物質のレセプターを発現しているものもある。

6) カルシウムイメージング

ICC と同定された細胞からペースメーカー機能と密接に関連する細胞内カルシウムの周期的な変動が記録された。細胞内カルシウムストアからの放出、および細胞外からの周期的なカルシウム流入がリズム発生に関与している。

S1-1. 遺伝子改変動物による血管平滑筋イオンチャンネルと Ca シグナリングの解析

東北大学・医・分子薬理学

柳澤 輝行, 村上 学

イオンチャンネルと Ca シグナリングを基にした平滑筋収縮弛緩機序に関する研究において、従来はコンパートメントの概念で説明されてきた一見矛盾する諸現象があった。分子・細胞下から組織レベルの構造と機能の研究において、生化学的にホモジェネートからスタートしたのでは小器官構築や膜電位などの機能は失われてしまい、一方、細胞内小器官や細胞・組織の形態的観察のみでは機能を推定するのみである。構造と機能の有機的な理解さらには病態解明のための有力な手法として遺伝子改変動物の作成とその解析がある。遺伝子生成物質とその関連小器官の推定されていた機能ばかりでなく、隠れていた機能や他物質・小器官の機能との関連や位置づけ、さらには従来返り見られてない生体物質の関与も明らかとなるなど、極めて幅広く奥が深い。

血管平滑筋細胞下のイオンチャンネル、Ca シグナリングと収縮・弛緩に関して、収縮に関与するのは Ca^{2+} 流入経路としての主に電位依存性 Ca^{2+} チャンネルと IP_3 受容体を介する振動性 Ca^{2+} wave が重要であるとされる。 Ca^{2+} wave 説によれば、血管収縮アゴニストの刺激により、 IP_3 生成と Ca^{2+} 流入が起こり $[Ca^{2+}]_i$ が振動性に筋全体に上昇し伝搬する。振動性 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と収縮には IP_3 受容体(主)とリアノジン受容体(従)とが関与する。両受容体ともに Ca 感受性を示し、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が波動として伝わって行く原因となる。一方、持続的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は細胞にとってむしろ不利益であり、これを処理する機構も重要である。種々の Ca 放出機構と Ca^{2+} 輸送系(筋小胞体・細胞膜 Ca ポンプ, Na-Ca 交換体; superficial buffer barrier 説: SR 内 Ca の細胞外への排出)の細胞小器官構築上での配置が明らかとなってきた。平滑筋といわれていた 3 型よりも 1, 2 型のリアノジン受容体を介する細胞膜直下の局所的な Ca^{2+} spark はむしろ Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャンネルを開いて一過性過分極(STOC: spontaneous transient outward (hyperpolarizing) current) により $[Ca^{2+}]_i$ 低下との弛緩を生じ、細胞小器官構築とフィードバック機構の位置づけも見えてきた。

他の分子細胞生物学的手法とともに、収縮に与る Ca^{2+} チャンネルと Ca^{2+} wave, 弛緩に寄与する Ca^{2+} spark と STOC という機能的現象の解明から明らかになってきた。イオンチャンネルと Ca シグナリング関連の細胞内小器官と種々の機能タンパク質の複合体的配置と精妙な相互の調節機構が我々の視野に入ってきた。本発表では血管平滑筋を中心にこれまでの Ca^{2+} チャンネルと Ca シグナリング関連遺伝子改変動物による解析を概観し、本シンポジウムの導入とする。

S1-2. 電位依存性 Ca^{2+} チャンネル β_3 サブユニット欠損マウスにおける中コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル発現量の解析

名古屋市立大学・薬・細胞分子薬効解析学¹, 東北大学・医・分子薬理学²

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

電位依存性 Ca^{2+} チャンネル (VDCC) はポアを形成する α_1 サブユニットとそれを修飾する $\alpha_2/\delta, \beta, \gamma$ サブユニットで構成され、平滑筋の Ca^{2+} 流入に重要な役割を果たしている。なかでも β サブユニットは電流量の決定、活性化・不活性化の調節、発現の促進などに関係しており、4 種類のサブタイプが同定されている。平滑筋では β_2 と β_3 サブユニットが強く発現しており、 β_3 サブユニット欠損マウスでは大動脈、膀胱平滑筋細胞の DHP 感受性 L 型 Ca^{2+} チャンネルの電流密度が減少することが報告されている。 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル (KCa) は大コンダクタンス (BK), 中コンダクタンス (IK), 小コンダクタンス (SK) に分類され、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇により活性化して過分極を誘発し、VDCC を抑制することにより細胞内 Ca^{2+} 濃度を減少させる。本研究では β_3 サブユニット欠損マウス ($\beta-/-$) での、細胞内 Ca^{2+} 動態に関連のある KCa の発現を検討した。RT-PCR により $\beta_3-/-$ 膀胱平滑筋の KCa の発現を検討したところ、IK の発現が野生型マウス (wt) では見られたのに対し、 $\beta_3-/-$ ではほとんど発現していなかった。そこで膀胱単離平滑筋細胞を用いて電気生理学的に IK チャンネルの発現量を検討した。細胞内 Ca^{2+} 濃度を 300 nM に固定し、ホールセルパッチクランプ下に -100 mV から +40 mV へのランパルスを送り、50 nM Cd^{2+} , 100 nM apamin 存在下に 600 μ M 1-ethyl-2-benzimidazolone (1-EBIO) で活性化される IK チャンネル電流量を比較したところ、 $\beta_3-/-$ の 1-EBIO 感受性の電流密度が 0 mV では約 60%, 10 mV では約 55% に減少していた。以上の結果は、 β_3 サブユニット欠損マウスの膀胱平滑筋細胞では、IK チャンネルの発現が抑制されている可能性を示していると考えられる。

S1-3. プロスタノイドの血管平滑筋細胞への作用とその生体での役割

旭川医科大学・薬理学

藤野 貴行, 高畑 治, 牛首 文隆

プロスタノイドの血管収縮・弛緩作用は良く知られているが、その血管平滑筋細胞の増殖・肥大や機能調節における役割は、必ずしも明らかではない。そこで我々は、これらの問題点を解明するため、各プロスタノイド受容体欠損マウスを用いた解析を行った。まず、プロスタノイドの血管平滑筋細胞の増殖・肥大に対する作用を、培養血管平滑筋細胞を用い検討した。その結果、プロスタグランジン (PG) E₂, PGI₂ がその増殖を抑制し、トロンボキサン (TX) A₂ がその肥大を促進することを解明した。ついで、この PGI₂ の血管平滑筋細胞に対する増殖抑制作用に焦点をあて、その生体での役割を解析した。方法として頸動脈結紮モデルを用い、血管リモデリングにおける PGI₂ の役割を検討した。その結果、PGI₂ 受容体 (IP) 欠損マウスでは、野生型マウスに比し著明な血管内膜肥厚の亢進が認められ、PGI₂ が血管リモデリングの場で重要な役割を果たすことが示された。一方、血管平滑筋細胞の機能調節におけるプロスタノイドの役割を解明するため、血管平滑筋が分化した細胞であり、腎臓の傍糸球体装置を構成するレニン分泌細胞への作用を解析した。方法として、腎血流量の低下によるレニン分泌亢進による高血圧をきたす腎血管性高血圧症のモデルである腎動脈狭窄マウス (2K1C モデル) を用い、解析を実施した。その結果、野生型マウスでは腎動脈狭窄によるレニン分泌やその mRNA の発現亢進が認められたが、IP 欠損マウスではそれらの著明な低下が観察された。さらに、野生型マウスで見られた高血圧も、IP 欠損マウスでは有意に低下しており、PGI₂ が腎血管性高血圧症の病態形成において重要な役割を果たすことが解明された。以上の結果、プロスタノイドは、血管平滑筋細胞の増殖・肥大やその機能調節において重要な役割を果たすことが明らかとなった。

S1-4. オキシトシン受容体 OTR 遺伝子欠損マウスの解析

東北大学・農・分子生物学¹, 東北大学・医・分子薬理², エモリー大学・行動神経科学センター USA³, 大阪府立成人病センター・婦人科⁴

西森 克彦¹, 高柳 友紀¹, 川又 理樹¹, 斉藤みのり², 柳澤 輝行², Larry Yang³
Thomas Insel³, 木村 正⁴

下垂体後葉性のホルモン、オキシトシン (OT) は僅か 9 アミノ酸からなるペプチドホルモンであり、脊椎動物に広く保存されているメソシンやバソプレシンと近縁の、最も古く発見された哺乳類由来ペプチドホルモンである。1900 年代初頭には子宮強直性をもたらす活性や乳汁射出活性についての報告が、また 1953 年には化学合成の報告がされている。OT はまた卵巣・精巣や種々の胎児組織などでも分泌され (peripheral oxytocin)、分娩時の子宮平滑筋の収縮と分娩の誘起、乳腺からの乳汁分泌、生殖行動制御など生殖に関わる多様な機能を持つホルモンと考えられている。我々はオキシトシン遺伝子欠損 (*otr*^{-/-}) 及びその受容体遺伝子欠損 (*otr*^{-/-}) 変異マウスを作成し、分子遺伝学的手法により OT とその受容体 OTR の両遺伝子が哺乳類において果たしている多様な機能についての解析実験を続けている。

・乳汁射出 *otr*^{-/-}、及び *otr*^{-/-} 雌マウスは共に乳汁射出機能に異常をきたし、生まれた仔マウスは生後 24 時間以内に餓死する。この母親マウスでは乳腺組織 (乳腺胞) の発達も未熟であり、OT/OTR システムが乳腺における乳汁射出制御に留まらず、乳腺の分化、形成にも関わっている可能性が示された。

・分娩誘導 OT はその強力な子宮筋収縮作用ゆえ、“quick birth”を意味する oxytocin と命名されたのだが、*otr*^{-/-} 雌マウスは分娩に全く異常を見せず、OT が果たすとされた分娩開始機能に対し大きな疑問が提示された (1)。*otr*^{-/-} マウスも *otr*^{-/-} の場合と同様に、分娩には殆ど異常はなく、少なくとも OT/OTR システムがマウスの分娩メカニズムの主要な部分を占めるとは考えづらい結果を示した。一方、Sugimoto Y. らはプロスタグランジン (PG) F_{2α} 受容体 (FP) 遺伝子欠損マウスで、分娩予定時期に分娩が起こらずその際子宮での *otr* 遺伝子発現上昇も見られない症状が、この *Fp*^{-/-} マウスの出産直前での卵巣切除により回復し、また子宮での OTR 発現上昇を伴ったことから、OTR が分娩開始に必須であると示唆している (2)。我々は相矛盾する此の二つの結果・解釈を同時に説明できるメカニズムの解明を目指し解析を続けている。

・生殖器官形成・生殖能力 両変異マウスでは、従来から言われてきた雄の精巣形成や様々な雄性的生殖能力については観察の範囲内では顕著な異常は見られなかった。しかし *otr*^{-/-} 雄マウスでは生殖行動に異常が見られ、また受胎率の有意な低下が観察された。一方、*otr*^{-/-} 雌マウスの分娩については著しい異常は見られなかった。*otr*^{-/-} 雌マウス子宮筋では OT と極めて近縁のバソプレシンホルモン (VP) に対する感受性が野生型に比べ著しく低下していることが観察され、VP の OT に対する相互代償作用の可能性が示唆された。マウス分娩時の子宮筋収縮における、OT/OTR システムに依存しないメカニズムの解明は今後の興味深い課題である。

・脳機能 *otr*^{-/-} 雄マウスでは個体識別能を失うこと (Social Amnesia) が報告されており (3)、OT/OTR システムが生殖に関わる脳機能を制御し、行動・記憶といった脳の高次機能に関わる役割をも担っている可能性が高い。

(1) Nishimori K., et al. PNAS 93: 11699-11704 (1996); (2) Sugimoto Y. et al., Science 277: 681-683 (1997); (3) Ferguson J. et al. Nature Genetics 25: 284-288 (2000)

S2-1. 血管平滑筋における炎症性サイトカイン IL-1 による NO 合成酵素発現機序

徳島大学・薬・薬理学

久山 哲廣, 篠原 靖幸, 福井 裕行

インターロイキン 1 (IL-1) は炎症性サイトカイン類の一つであり多くの common disease を含む難治性炎症性疾患の発症・維持に重要な役割を果たしており, その作用発現には転写因子 NF- κ B の核内輸送が必須であるとされている。誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) は IL-1 により発現する最も重要な起炎性タンパクの一つで, 細胞障害を誘発させる一方で強い降圧反応も引き起こす。我々は IL-1 受容体を介した iNOS 遺伝子発現経路を明らかにするためにラット iNOS 遺伝子の発現調節領域の構造と機能について, シグナル伝達を考慮した立場からレポーター遺伝子を用いた解析を試みた。レポーター遺伝子はリポソーム法を用いて培養ラット大動脈平滑筋細胞に形質導入した。

ラットゲノム NDA より調節した iNOS 遺伝子の転写開始部位近傍の構造解析により従来報告されていた 2 つの κ B site の他に新たに 2 つの κ B site が存在することを見出すことができた。変異解析の結果, 転写開始部位より上流に存在する 3 つの κ B site はいずれもエンハンサーではなくプロモーターとして機能し, IL-1 による転写活性化にはこれら 3 つのすべての κ B site の存在が必須であることが示された。一方第 1 イントロンに存在する κ B site には主たる機能は無いように考えられた。

ところで Protein kinase C 阻害薬である Ro 31-8220 を処置しておくとも IL-1 刺激によるレポーター遺伝子の転写活性化は完全に阻止されたが, Ro 31-8220 は NF- κ B の核内移行に対しては何ら抑制効果を示さなかった。これらの知見は IL-1 受容体を介した iNOS 遺伝子の発現には NF- κ B の転写調節領域への結合が必要ではあるが, NF- κ B の活性化に至る系だけにとどまらず Protein kinase C に依存した未知の系の存在もまた必須であると考えられた。

S2-2. IL-1 β による平滑筋収縮性の修飾

東京大学・農・獣医薬理学

尾崎 博, 堀 正敏, 佐藤 晃一, 唐木 英明

【目的】 動脈硬化の発症には血小板や単球系の細胞が深く関与し, 血管平滑筋は各種のサイトカインや増殖因子の影響を受けている。この様な観点から, 我々はこれまで, ラット大動脈平滑筋に及ぼす IL-1 β の長期作用を検討し, 一酸化窒素産生の亢進に依存するものとこれに依存しない収縮抑制の機序が存在することを報告してきた (Takizawa et al., EJP 330, 143-150, 1977)。一方, 血管平滑筋に限らず他の多くの平滑筋に関しても, 炎症性病変部では種々の免疫系細胞由来のサイトカインの影響下にあると考えられる。特に消化管平滑筋層には炎症時に多くの免疫系細胞が浸潤することが知られており, 消化管平滑筋におけるサイトカインの長期作用についての知見が求められている。本研究では, 特にクローン病や潰瘍性大腸炎などの炎症性腸炎において重要な役割を果たすサイトカインである IL-1 β の消化管平滑筋に対する長期作用を器官培養法により検討した。

【結果】 培養液中でラット回腸を器官培養し, IL-1 β (10 ng/ml) を最長 7 日間作用させ, 高濃度 K ならびにカルバコールの収縮性の変化を観察した。IL-1 β を作用させると 3 日以降から収縮が抑制された。これらの抑制は一酸化窒素やプロスタグランジン産生阻害剤で影響を受けなかった。またスキンドファイバーにおける最大張力を比べたところ, IL-1 β はその最大張力を抑制したが, Ca 感受性には影響しなかった。また, 平滑筋組織の α -actin とミオシン軽鎖含量に差は認められなかったが, カルバコール刺激によるミオシン軽鎖のリン酸化を有意に抑制した。

【考察】 以上の成績から, 今回観察された IL-1 β による平滑筋抑制作用には, 主として平滑筋収縮蛋白質抑制機構の変化が関与するものと思われた。各種の炎症性腸疾患では運動機能障害が起こり, 直接あるいは間接的に消化管機能に様々な悪影響を与える。上記の反応が, 炎症性腸疾患における運動機能障害の一因となっていることが示唆された。

本シンポジウムでは, 以上の成績に加え, 筋層内に存在する常在型マクロファージとサイトカインとの関係についての知見もあわせて紹介したい。

S2-3. 消化管のペースメーカー機構とその病態生理

東海大学・医・消化器内科¹, 山梨医科大学・第一内科²

高山 一郎¹, 醍醐弥太郎², 藤野 雅之², 峯 徹哉¹

消化管のペースメーカーは、カハールの介在細胞 (interstitial cells of Cajal; ICC) から成る。ICCには、大きく2つの種類がある。ひとつは筋層内に分布する紡錘型のICC (intramuscular ICC; IC-IM)であり、神経-筋伝達の役目を持つと考えられている。他のひとつは、筋層間でネットワークを作る多突起型のICC (ICC at the level of the myenteric plexus; IC-MY)であり、スローウェイブを発生している。2つのICCはギャップ結合で同期し、消化管の繊細な動きを整えている。

ICCが欠落した動物の胃腸では、*in vitro*の筋の収縮力は保たれているが、*in vivo*では胃腸管は弛緩する傾向を示す。トランスデューサー法で調べると、協調収縮が損なわれ収縮波群が形成されていないことが分かった。言い換えれば、胃腸管が一種の「細動」状態に陥っている訳であり、心臓の不整脈と同様の考え方に基づいて、消化管の運動障害を評価することができる可能性が示唆された。便秘や下痢は「消化管の不整脈」であるのかもしれない。実際に、動物モデル (NOD マウス) でみられる糖尿病性胃腸症は、胃のペースメーカーの機能が障害されている。

最近、常在性マクロファージが、ある条件の下でICCの機能を代行することが報告されている。ICCと免疫機構は何らかの機能相関がある可能性がある。しかしこの詳細、とりわけ分子メカニズムに関する知見は少ない。我々は既に、ペースメーカー欠損マウスの胃腸筋層におけるRNA発現差をディフレンシャルディスプレイ法、DNAマイクロアレイ法により解析し、詳細な発現プロファイルを得ている。今回、この結果を再検討し、免疫機構との関連を探ることを試みる。

S2-4. In vitro における結腸壁内神経系に対する IL-1 β の検討

日本歯科大学・歯・外科学¹, 日本大学・医・外科学²

富田 涼一^{1,2}, 池田 太郎², 藤崎 滋², 丹正 勝久², 福澤 正洋²

【目的】これまで、動物実験でIL-1 β をはじめとするサイトカインが、腸管壁内神経系の調節作用をしていることが報告されてきた。しかし、ヒト腸管壁内神経系に対する検討はみられない。そこで、われわれは、In vitro におけるヒト結腸壁内神経系に対するIL-1 β の作用を検討した。【対象と方法】左側結腸癌4例 (男性2例, 女性2例, 52~60歳, 平均55.4歳)の正常S状結腸筋条片 (n=12)について、In vitro でmechanogram法を用いてIL-1 β の作用を観察した。【成績】1) 交感・副交感神経遮断後のIL-1 β 反応; IL-1 β は濃度依存性に弛緩反応を示した (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} g/ml, おのおので0%, 33.3%, 41.7%, 66.7%が弛緩反応を示し, その他は無反応であった)。 1×10^{-6} g/mlは 1×10^{-9} g/mlより有意に弛緩反応を示した ($p < 0.001$)。2) テトロドトキシン投与後では, すべての筋条片がIL-1 β (1×10^{-6} g/ml)に対し無反応であった。3) NG-nitro-L-arginine (L-NNA) (1×10^{-6} g/ml)投与後のIL-1 β (1×10^{-6} g/ml)反応は, 91.7%が無反応であった。【結論】1) 交感・副交感神経遮断下において, IL-1 β はヒト正常S状結腸を弛緩させた。2) テトロドトキシンやL-NNA投与下ではIL-1 β の作用は認められなかった。以上のことから, IL-1 β は腸管壁内神経に直接作用してnitric oxideを放出させ, 弛緩反応を呈するものと思われた。

S2-5. 正常・過敏性腸症候群大腸粘膜のマクロファージ，神経，平滑筋，および c-kit 陽性細胞の形態

東北大学・医・心療内科¹，同・医・病理形態学²，同・医・人間行動学³
同・医療技術短期大学部⁴，同・医・総合診療部⁵

太田 達郎^{1,2}，福土 審³，長澤 千鶴⁴，大谷 明夫²，増田 高行⁴，本郷 道夫⁵
名倉 宏²

機能性腸障害の代表疾患である過敏性腸症候群 (Irritable bowel syndrome: IBS) の病因の一つに post-infectious IBS がある。下部消化管粘膜の炎症・サイトカイン放出後に消化管知覚過敏と消化管運動異常が生ずる機序が考えられる。最近，固有筋層神経筋組織，固有筋層 c-kit 陽性カハール細胞とマクロファージの相互関係が注目されている。正常ヒト大腸組織のマクロファージ分布，粘膜固有層内の神経線維および筋線維，粘膜筋板，c-kit 陽性細胞の分布および形態を検討し，IBS 患者 S 状結腸粘膜と比較検討した。ヒト正常大腸において，粘膜固有層内に c-kit 陽性細胞，一部 toluidine blue で二重陽性にならない c-kit 陽性細胞を認め，粘膜下神経叢内に少数の CD68+マクロファージが観察された。 α -SMA の免疫染色では，粘膜筋板は薄い層をなし，粘膜内筋線維は腺管に沿い，細く被覆上皮下まで伸びる像が見られた。IBS 患者 S 状結腸粘膜では，マクロファージの減少，粘膜固有層基底部分での泡沫化，集簇化，ならびに粘膜筋板の肥厚を認めた。粘膜固有層内筋線維は粘膜の基底部分で太く，分布が不規則で走行が不整であり，神経線維や筋線維の泡沫化像が認められた。以上の所見と IBS の消化管知覚過敏・消化管運動異常との関連が示唆される。

P-1. 気道平滑筋の特性と自律神経支配

九州大学・医・生体情報薬理学

伊東 祐之

一般に平滑筋細胞の収縮-弛緩サイクルは細胞内自由 Ca^{2+} 濃度によって調節されている。細胞内自由 Ca^{2+} 濃度の上昇は膜脱分極により開口する L-型 Ca^{2+} チャネルを介して細胞外から流入する Ca^{2+} と、筋小胞体 (SR) から放出される Ca^{2+} によりもたらされ平滑筋細胞は収縮する。気道平滑筋細胞膜は電氣的に非活性で活動電位の発生は観察されず、一部の動物種において自発徐波の発生が観察される。徐波の発生は多くの場合、張力の発生を引き起こし、また ACh, ヒスタミン, LTs によるスパズム発生時には徐波の頻度の増加が観察されるので、徐波は収縮をもたらす因子の一つである。一方、 K^{+} -脱分極や電氣的通電により求めた収縮発生の閾値はイヌ気管平滑筋の場合 10 mV であるが、ACh や神経刺激による e.j.p. の場合、その大きさが 4 mV に到達すると筋収縮を引き起こす。すなわち気道平滑筋は、膜脱分極によるよりむしろ pharmacomechanical coupling を介して細胞内 Ca^{2+} の遊離により収縮を引き起こすと考えられる。また 128 mM $[\text{K}]_o$ による収縮を 1.0 とすると ACh (10^{-5} M) による収縮の大きさは 2.5 ± 0.2 ($n=10$) であり、膜脱分極に比べ ACh ははるかに大きな収縮を引き起こす。即ち気管平滑筋では、化学受容体刺激による PLC 活性化 \rightarrow IP_3 産生 \rightarrow Ca^{2+} 遊離が収縮発生の主たる経路と考えられる。

気道平滑筋を支配する末梢自律神経は、ACh や NAd のみならず NO や種々のペプチドを神経伝達物質とする。すなわち気道を支配する迷走神経系は ACh, NO 及びペプチド性伝達物質である VIP として ATP を放出する。ACh は気道平滑筋に収縮をもたらすが、NO や VIP として ATP は、NANC 弛緩をもたらす。また気道に分布する知覚神経系にはタキキニン (substance P, (SP) ニューロキニン A 及び B) が存在し、感覚神経の逆行性興奮により放出される。これらの伝達物質は、神経因性炎症の原因と考えられている。

P-2. 遺伝子操作マウスを用いたアレルギー性気道過敏性の解析

岐阜薬科大学・薬理

田中 宏幸, 永井 博弐

アレルギー反応による気道過敏性の発症には、様々な細胞、脂質メディエーター、サイトカイン等が関与することが示唆されている。すなわち、これまでの多くの基礎研究により、その発症にはヘルパー2型 T (Th2) 細胞の分化に関わる機能分子、Th2 細胞が産生する種々のサイトカイン、炎症性細胞の気道局所への遊走に重要なケモカイン、細胞間相互作用に必須の細胞表面分子、アラキドン酸代謝産物およびガス状メディエーター等の関与が推察されている。これらの多くの成果は、機能分子に対する抗体や拮抗薬あるいは阻害薬の他に、近年、遺伝子工学の進歩により開発された多くの遺伝子操作マウスから得られた成績によるところが大きい。すなわち、遺伝子操作マウスには、遺伝子を過剰に発現させたトランスジェニックマウスと遺伝子を先天的に欠損させたノックアウトマウスが用いられ、それぞれの表現型をその野生型マウスと比較することにより、特定遺伝子あるいは機能分子の役割が解析されている。教室においても、マウスアレルギー性気道炎症および気道過敏性モデルを作成し、その発症における種々の機能分子の意義をそれぞれのトランスジェニックマウスあるいはノックアウトマウスを用いて検討している。

本ワークショップでは、これらの遺伝子操作マウスを用いたこれまでの検討結果を総括するとともに、アレルギー反応によって生ずる気道過敏性の発症機序に関し、教室で得られた成績をもとに、これらのマウスを用いた研究の有用性およびその限界について論ずる。

P-3. 炎症気道での神経性調節

九州大学・医・胸部疾患研究施設¹, 久留米大学・医・第一内科²

松元幸一郎¹, 井上 博雅¹, 原 信之¹, 相沢 久道²

気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患はいずれも持続する炎症が基本病態であるが、その過程にはいかなる神経性因子が関与しているであろうか。我々の動物実験およびヒトでの検討結果を示したい。

モルモットにタバコ煙を曝露すると気道収縮・血漿漏出・好中球性炎症が生じるが、これはタキキニン拮抗剤で消失することからカプサイシン感受性知覚神経を介する反応である。しかし気道収縮は抗コリン剤やトロンボキサン阻害剤でも一部抑制され、しかも両薬剤の相加効果がみられないことからトロンボキサン産生を介したコリン作動性収縮が関与していると考えられる。またタバコ煙による収縮は β 遮断剤で増強し α 遮断剤の併用で更に増強すること、それらの増強反応は抗コリン剤併用下ではみられないことからコリン作動性収縮がアドレナリン作動性神経の調節を受けていることを示す。

アレルギー吸入による即時反応は肥満細胞から脱顆粒したヒスタミンによる気道収縮とされている。モルモットのヒスタミン吸入による気道収縮はNO合成阻害剤で増強し、その作用は β 遮断剤と抗コリン剤の併用下でもみとめられた。更にこの増強作用は神経節遮断剤や迷走神経切断・星状神経節除去で消失したことから内因性の非アドレナリン性非コリン性抑制性神経の存在を示唆する。

摘出ヒト気管支平滑筋切片の電気刺激による収縮反応は抗コリン剤やそれ自体が平滑筋を弛緩させない低濃度の β 刺激剤で減弱する。健常者および軽症喘息患者ともにヒスタミン吸入による気道収縮は抗コリン剤や低濃度 β 刺激剤の吸入で減弱することから一部は神経性収縮を介することが判る。軽症喘息患者においてNO合成阻害剤吸入はヒスタミン吸入による気道収縮を増強したが、この増強作用は健常者ではみとめられなかった。これらの検討結果からヒトの炎症気道においても非アドレナリン性非コリン性抑制性神経が機能しているものと考えられる。

P-4. 病態、治療が及ぼす気道平滑筋調節への影響—イオンチャネルを介した効果

名古屋大学・医・機能調節内科

久米 裕昭, 小熊 哲也, 石川 貴之, 長尾 能雅, 近藤 征史, 伊藤 康
山木 健市, 下方 薫

目的: β アドレナリン受容体の反応性の低下は気管支喘息患者の特徴である。この疾患の病態, 治療が β 刺激薬の反応性に及ぼす影響について, イオンチャネルを介した細胞内 Ca^{2+} 動態の役割, およびadenylyl cyclase (AC)-cAMP-protein kinase A (PKA) 系の関与を中心について検討した。

方法: プタの気管平滑筋から酵素処理により単離平滑筋細胞を作製し, cell-attached, inside-out の状態で Ca^{2+} 依存性 K^+ (K_{Ca}) チャネルの電流を記録した。モルモット気管平滑筋の切片をfura-2で処理し, 等尺性張力とF340/F380を同時記録し, 張力と細胞内 Ca^{2+} 濃度との関係を検討した。

結果: $1\ \mu M$ イソプロテレンール (ISO) の投与で活性化された K_{Ca} チャネルは, 5分間の投与を10分毎に繰り返すと次第に低下し, 6回目の投与で開口確率は初回の9.8%になった。一方, 同様に10 U/ml PKAを細胞質側へ反復投与すると開口確率は逆に次第に上昇し, 開口確率は初回の1.9倍になった。 $1\ \mu M$ メサコリンの収縮に対する $0.3\ \mu M$ ISOの弛緩作用は, 5分間投与を15分毎に繰り返すと, 次第に減弱した。この時, ISOのF340/F380の抑制率も減少した。これらの現象は, 電位依存性 Ca^{2+} (VDC)チャネル阻害剤で著明に抑制にされた。 $10\ \mu M$ フォルスコリンでACを直接刺激した時, β 刺激薬と異なり反復投与によりその弛緩効果は次第に増加した。phospholipase A_2 の代謝産物であるlysophosphatidylcholineの持続暴露後もISOの弛緩作用はその暴露時間依存性に低下したが, ISOによるF340/F380の抑制率は変化がなく, 細胞内 Ca^{2+} 動態には影響を及ぼさなかった。

結論: β アドレナリン受容体の反応性低下は, cAMP非依存性の K_{Ca} チャネル活性化の抑制による脱分極がVDCチャネルを活性化し, それに基づく細胞内への Ca^{2+} 流入によって生じる。しかし, 炎症病態による反応性の低下は, 機序が異なり Ca^{2+} 動態ではなく, Ca^{2+} 感受性の増加が関与している。

P-5. 気管支拡張薬の臨床上の用いられ方

東北労災病院・呼吸器科¹，東北大学・医・感染症呼吸器内科²

三浦 元彦¹，一ノ瀬正和²

気管支拡張薬は，従来，気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）といった閉塞性換気障害を呈する呼吸器疾患に用いられてきた。本発表では，気管支喘息，COPD，それぞれにおける各種気管支拡張薬の現状につき文献的考察を中心に提示する。

気管支喘息において，吸入ステロイドによる気道炎症の抑制が長期喘息管理の中心であることは疑いない。しかし， β 刺激薬やテオフィリン製剤といった気管支拡張薬も，種々の喘息治療ガイドラインにおいて，発作時のリリーバーとしてのみならず，長期管理薬としての吸入ステロイドの補助薬として位置付けられている。このなかで，最近，本邦でも使用可能となった長時間作動型 β 刺激薬（long-acting beta-2-agonist：LABA）は，すでに欧米で臨床使用されており，長期連用によっても喘息症状の急性増悪の頻度を上昇させることなく安定した喘息症状のコントロールを呈する，と報告されている。特に LABA と吸入ステロイドの併用が有効とされ，両者の合剤が今後の喘息の長期管理の主役の一つとなると考えられている。また，喘息気道における主要な気道収縮物質である LT の拮抗剤もまた喘息患者においては，気管支拡張作用を持ちうる。

COPD もまた，気道への有害物質の慢性暴露によって生ずる炎症性変化がその主体であるが，気道の可逆性は喘息と比べ小さい。しかしながら，COPD にステロイドは基本的に無効であり，気管支拡張薬が薬物療法の中心となる。また，COPD は常に労作時に息切れが生じうるため，長時間作動型の気管支拡張薬の利便性が高い。このうち，近々本邦でも臨床使用が可能となる長時間作動型の抗コリン剤であるチオトロピウムは，一日一回の吸入で COPD 患者の QOL の改善が期待でき，COPD 治療の基準薬となると考えられる。

P-6. Clinical Overview：閉塞性肺疾患の病態と気管支拡張薬の方向性

東北大学・医・感染症呼吸器内科

一ノ瀬正和

臨床上用いられる気道平滑筋作動薬（気管支拡張薬）は，気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患（Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD）といった閉塞性肺疾患を対象としている。気管支喘息に関しては，病態の捕らえ方が従来の「気管支平滑筋のスパズム」から，最近では「肥満細胞，好酸球，リンパ球を中心とした気道の慢性炎症」と変わってきた。そのため， β 2 アドレナリン受容体刺激薬を代表とする気管支拡張薬中心の治療から，吸入ステロイドによる気道炎症抑制が現在の喘息治療のスタンダードとなっている。もちろん，吸入ステロイドの抗炎症作用のみで，気管支喘息がコントロールされている場合は問題ないが，ウイルス感染等を引き金として，発作が起こることはしばしば見受けられる。これは，気管支喘息患者がもつ気道過敏性（少しの気道への刺激で容易に気管支狭窄を起こす特性），及び慢性炎症の結果起こった気道壁の再構築によるものと理解される。こういった，喘息での気道炎症制御が十分な場合の発作予防の面から，気管支拡張薬は今後とも治療上必要である。本邦では，テオフィリン製剤，抗ロイコトリエン薬に加え， β 2 アドレナリン受容体刺激薬の長期作動薬（LABA）が用いられる。

一方，COPD であるが，2001 年の本邦初の疫学調査で，罹患数 530 万人が推定され，その管理の重要性が指摘されている。COPD も喘息同様炎症が疾患の本態であるが，喘息と異なりステロイドが無効である。よって，現時点での治療の中心は気管支拡張薬の投与であり，抗コリン薬が最も有効である。

本発表では，喘息，COPD の安定期や増悪期の病態と気管支拡張薬の効果を中心に概説する。

1. 21 channel topographical esophageal manometry (TEM) による食道運動機能の評価 (第1報)

日本医科大学・第三内科

岩切 勝彦, 林 良紀, 琴寄 誠, 杉浦 敏昭, 川上 明彦, 坂本 長逸

目的: 21 channel TEM による食道運動機能評価の有用性を検討する。方法: 21 カ所の side hole を有するカテーテルを使用し, infused catheter 法 (0.15 ml/min) により測定した。内圧カテーテルは, 遠位より胃食道接合部周辺の内圧を測定するための side hole が 1cm 間隔で 9 カ所, その上方には食道下部~中部を測定するための side hole が 2 cm 間隔で 8 カ所, またその上方に上部食道から UES, 咽頭の内圧を測定するための side hole が 4 カ所の計 21 チャンネルの side hole を有する。カテーテル挿入後, LES 上端に 1 cm 間隔に存在する side hole の上端を設置した。測定した圧 data は解析ソフト (Trace! 1.1) を使用し color 圧データに変換後, PC モニターに topographic plots として表示された。先端の胃チャンネルを比較チャンネルとし補正後, 食道運動機能の解析を行った。対象は健常者, 逆流性食道炎, dysphagia 症例である。一部症例には LES 口側 5 cm での pH 測定も同時に行った。結果: 1) sleeve catheter では LES 圧が極めて低値である症例では catheter の位置決めが容易ではないが, TEM では, catheter の位置決めが容易であり, また, LES 長も判定可能であった。2) TEM では, 呼吸による内圧の変化が容易に判定できた。また食道内圧と胃内圧の違いが明らかに表示され achalasia 等の診断に有用であった。3) sleeve catheter と同様に LES の弛緩が判定できると同時に, sleeve catheter による測定では食道裂孔ヘルニアの診断は困難であるが, TEM では食道裂孔ヘルニアの存在, 大きさを容易に判定できた。4) 通常食道体部 4 カ所の食道内圧測定では判定できない一次蠕動波の focal failure を認識でき, より正確な食道体部運動の評価が可能であった。5) 長時間の測定では, 一過性 LES 弛緩, Common Cavity の判定も可能であった。結論: 21 channel TEM はより詳細な食道運動機能の評価を可能とする。

2. 細径超音波プローブを用いた進行性全身性硬化症患者における食道運動機能の評価

広島大学・医・分子病態制御内科学¹, 川崎医科大学・消化器内科 II²

眞部 紀明¹, 春間 賢², 畠 二郎¹, 原 睦展¹, 楠 裕明², 田中 信治¹
茶山 一彰¹

【背景】進行性全身性硬化症 (PSS) 患者における合併症に食道運動機能異常を基盤とした逆流性食道炎 (RE) があり, しばしば重症型として経験される。我々は, これまでに細径超音波プローブ (MUP) を用いて RE 患者における飲水時の食道運動を断層像としてリアルタイムに評価できる事を報告してきた (Scand J Gastroenterol 2002, in press)。【目的】MUP を用いて, PSS 患者における食道運動の特徴を検討した。【対象と方法】内視鏡的に RE を認めた PSS 患者 10 例 (PSS 群), 膠原病を有さず術後胃を除く RE 患者 10 例 (RE 群) を対象とした。16Fr の Gastric tube を経鼻挿入し, 更にその内腔に 20 MHz の MUP を挿入した。下部食道括約部 (LES) を同定した後, LES より 5 cm, 10 cm, 15 cm 口側において水 20 cc をそれぞれ嚥下した際の食道内輪筋, 縦走筋の収縮率, 食道壁の compliance (最大伸展時の食道管腔径), 食道収縮様式について検討した。【成績】PSS 群では, RE 群に比し内輪筋層の収縮率の低下傾向を示した。また, PSS 群では, 食道壁の compliance は, LES より 5 cm, 10 cm 口側で有意に低下していた。収縮様式については, RE 群では, 半数に, PSS 患者では全例で食道管腔の不完全閉塞が見られた。【結論】PSS 患者では食道内輪筋層の収縮率の低下傾向が認められ, そのため食道収縮時に管腔の完全閉塞しない事が考えられた。また, 食道壁の compliance の低下があり, 粘膜下組織の結合織増殖との関連性が示唆された。

3. 小腸運動と中枢機能の関連について—生理学的指標を中心に—

東北大学・医・心療内科¹, 同・医・人間行動学², 同・医・総合診療部³

野村 泰輔¹, 相模 泰宏¹, 佐竹 学¹, 遠藤 由香¹, 庄司 知隆¹, 唐橋 一人¹
 福土 審², 本郷 道夫³

【目的】過敏性腸症候群患者の小腸運動は、日中と夜間において異なり、中枢神経系が、消化管運動に大きな影響を与えている。我々は、中枢神経活動と消化器運動の関連を睡眠中の脳波変化と小腸運動の変動を同時に記録することにより検討した。同時に心電図周波数解析を用いて、自律神経系活動を評価した。【方法】対象は健康成人7名・年齢18-25歳である。検査日午前9時より絶飲絶食とし、午後3時より、マイクロチップ圧トランスデューサーを装着したカテーテルを経鼻的に挿入し近位空腸に留置する。カテーテルには先端から15cm間隔で3箇所センサーを取り付け、各部位における圧力を測定した。データは携帯型記録装置に記録し、同時にホルター心電計より、心拍変動を記録した。脳波は、頭頂中心部(C_z)より導出し、終夜脳波を記録した。被検者は22:00-24:00に就寝し、翌朝AM7:00に覚醒させた。その後、小腸内圧カテーテルを抜去し記録を終了した。小腸運動評価:小腸運動は、睡眠時における収縮周波数、圧、持続時間を解析した。自律神経機能評価:心臓心拍変動は、AR法を用いて解析し、交感神経成分(LF/HF)と副交感神経(HF)成分を抽出評価した。睡眠深度の評価:キッセイコム社製Sleep Sign Ver2.0を用いて解析した。さらに、小腸運動におけるphase I, II, IIIと自律神経・睡眠深度の関連を検討した。【結果】LF/HFは睡眠深度の深まりとともに減少し、REM睡眠では増加した。HF成分はS2-S4で、睡眠深度とともに減少しREM睡眠では覚醒時以上に増加した。小腸運動は、睡眠深度とともに減少し、REM睡眠時は増加した。【結論】睡眠深度と小腸運動に関連が認められた。本研究は、東北大学医学部倫理委員会の承認を得、被検者の同意のもと実施した。

4. 胃電図で見た Shy-Drager syndrome の一例

東北大学・医・心療内科¹, 同・医・総合診療部², 岩手県立北上病院・消化器内科³

相模 泰宏¹, 森下 城³, 野村 泰輔¹, 遠藤 由香¹, 庄司 知隆¹, 唐橋 一人¹
 佐竹 学¹, 本郷 道夫²

Shy-Drager syndrome (SDS) は、多系統萎縮症の一つで自律神経障害を主たる徴候とした疾患である。胃電図は胃の運動機能ならびに自律神経機能を反映する検査法であるが、SDSにおける胃電図検査の結果は報告がない。我々はSDSの1例において胃電図検査を施行、解析したので報告する。【症例】54歳、男性。平成10年4月、便秘出現。平成11年4月、便秘増強し抑うつ症状も出現。同年7月地元の総合病院受診し消化管検査するも異常なく、8月同院心療内科にてうつ病と診断。平成12年よりめまい、ふらつきが出現、徐々に増悪し排尿障害も認めた。同年11月より歩行障害出現。平成13年1月に精査加療のため当科入院。入院時身体所見、血液検査、胸腹部X線異常なし。起立性低血圧を認め、CVR-Rは安静時1.22%、深呼吸時1.05%と著明に低下。神経学的にロンベルグ試験陽性、失調歩行、衝動性眼球運動障害を認め、神経因性膀胱の併存を認めた。以上の結果よりSDSと診断した。消化器症状は便秘のみであったが、胃の運動機能、自律神経機能障害の有無の検討のために胃電図検査を施行した。【胃電図所見】Nipro LE4にて記録。空腹時は3cpmの律動波が明確に記録されたが、食事摂取後は規則性を持った波形は消失。健常人では安静時に胃の電氣的活動が低下し食事で賦活されることと対照的である。睡眠時は活発な3cpmの電気活動が記録された。【結語】SDSでは自律神経機能障害に基づく胃の運動機能障害が認められることが示唆された。

5. マウス下部食道括約筋における抑制性神経伝達の電気生理学的検討

名古屋市立大学・医・生理学

今枝 憲郎, 鈴木 光

【目的】下部食道括約筋 (LES) の嚥下に伴う弛緩反応には抑制性神経の関与が重要と考えられている。この神経の伝達物質にはこれまで NO や VIP が報告されているが、他の伝達物質の関与も示唆されている。我々はマウス LES を用いて、抑制性神経-平滑筋の興奮伝達機構における神経伝達物質及び関与するイオンチャンネルについて電気生理学的に検討した。【方法】マウス LES 輪走平滑筋より 1×7~8 mm 長に切離した筋条片を作製した。Krebs 液灌流下にガラス微小電極法で細胞内電位を測定し、経壁の電気刺激により誘発される抑制性接合部電位 (IJP) を測定した。【結果】マウス LES 輪走平滑筋の静止膜電位は平均 -45.0 mV で、atropine (1 μ M) 存在下に電気刺激により誘発された IJP は持続時間が約 2 秒で振幅が約 20 mV の一過性の成分 (fast IJP) と持続時間が約 10~20 秒で振幅が約 10 mV の持続性の成分 (slow IJP) で構成されていた。slow IJP は guanethidine (5 μ M) に抵抗性で L-NNA (100 μ M), ODQ (1 μ M), glybenclamide (10 μ M) により消失した。fast IJP は guanethidine (5 μ M) により 71% に、PPADS (30 μ M) により 75% に、apamin (0.1 μ M) により 79% に抑制された。さらに fast IJP は L-NNA (100 μ M) により 39% に、ODQ (1 μ M) により 46% に抑制され、加えて apamin (0.1 μ M) 存在下における fast IJP の残存成分は ODQ (10 μ M) によりほぼ消失した。【結果】slow IJP は NANC 神経から放出された NO が cGMP を介して ATP 感受性 K⁺ チャンネルを活性化して発生していると考えられた。fast IJP はアドレナリン作動性神経から放出された ATP による apamin 感受性 K⁺ チャンネルの活性化、ならびに NANC 神経から放出された NO による cGMP を介した apamin 抵抗性チャンネルの活性化により発生すると考えられた。

6. 脱分極によるモルモット胃輪走平滑筋の興奮発現に関する細胞内機序

名古屋市立大学・医・生理学

鈴木 光, 鬼頭 佳彦, 福田 裕康, 山本 喜通

モルモット胃輪走平滑筋を摘出し、2本の細胞内電極で膜電位を測定すると、任意の2細胞の活動は同期していた。一方の電極から通電すると、発生した電気緊張電位を他方の細胞から記録できた。電気刺激の強さを増していくと、電気緊張電位の上に緩電位が誘発された。緩電位発生に必要な脱分極には閾値があり、また緩電位の発生した後はしばらく緩電位の発生できない期間 (不応期) がみられた。不応期は脱分極の大きさで持続時間により反比例的に変化した。緩電位発生の不応期が生ずる機構について調べた。小胞体 Ca ポンプ抑制薬 (thapsigardin), IP₃ 受容体抑制薬 (2-aminoethoxy diphenylborate), ミトコンドリア膜のプロトノホア (CCCP) 等は緩電位の振幅を低下させたが、不応期を変化させなかった。プロテインキナーゼ C の抑制薬 (bisindolylmaleimide I, chelerythrine) は不応期を延長させ、緩電位の振幅を著明に変化させないか、わずかに低下させた。低濃度 (1 nM) のプロテインキナーゼ C 活性化薬 (phorbol-12-myristate-13-acetate) は緩電位の振幅を増大させ、不応期を短縮させたが、高濃度 (1 μ M) の phorbol-12-myristate-13-acetate は振幅を低下させ、不応期を延長させた。アセチルコリンは緩電位の振幅を増大させ、不応期を短縮させた。アセチルコリンによる緩電位振幅増大は 2-aminoethoxy diphenylborate により抑制され、不応期短縮は bisindolylmaleimide I や chelerythrine で抑制された。そこで緩電位の振幅は小胞体から遊離される Ca²⁺ 量により規定され、多くの Ca²⁺ が遊離されると緩電位の振幅が増大すると思われた。また緩電位発生の不応期はプロテインキナーゼ C の活性と関連していると思われた。以上の結果から、膜の脱分極は先ずプロテインキナーゼ C を活性化 (あるいは膜側への移動) することによって IP₃ 産生を増大させ、緩電位発生を促進する機構が考えられた。

7. モルモット胃幽門部ペースメーカー電位の構成成分について

名古屋市立大学・医・生理学

鬼頭 佳彦, 鈴木 光

モルモット胃幽門部から記録されるペースメーカー電位に対する脱分極の影響について細胞内電位を指標にして調べた。ペースメーカー電位は立ち上がりの速い成分とその後発生するプラトー成分の二つの成分から成っていた。プラトー成分は、シクロピアゾン酸、低濃度 Cl 溶液、DIDS で抑制された。これより、プラトー成分の発生には細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 遊離と Cl コンダクタンスが関与していると思われた。外液のカリウムの濃度を通常の 5.9 mM から 10.6 mM, 15.3 mM, 20.0 mM, 24.7 mM へと増加させていくと、膜は濃度依存性に脱分極し、ペースメーカー電位の頻度は増加し、振幅は減少した。また、立ち上がりの速い成分が抑制されたことから、立ち上がりの速い成分とプラトー成分とでは電位依存性が異なることが示唆された。通常の Krebs 液 (5.9 mM $[K^+]$) 中ではシクロピアゾン酸はプラトー成分のみを抑制したが、15.3 mM $[K^+]$ で脱分極させた状態ではシクロピアゾン酸はペースメーカー電位を完全に消失させた。このことから、高濃度カリウム溶液で脱分極させた状態では、立ち上がりの速い成分は抑制され、プラトー成分のみが発生していると思われた。以上より、モルモット胃幽門部のペースメーカー電位は、立ち上がりの速い成分とプラトー成分とで発生機序が異なり、前者はより強い電位依存性がある Ca^{2+} 透過性チャネルであり、後者は細胞内 Ca 貯蔵部位から遊離される Ca によって活性化される Ca^{2+} 依存性 Cl チャネルであることがわかった。また各成分は細胞内の歩調とり機構により別々に活性化されることがわかった。

8. 糖尿病性胃腸症モデルにおける消化管ペースメーカーの障害

東海大学・医・消化器内科

高山 一郎, 峯 徹哉

【背景】 糖尿病性胃腸症は、自律神経性の胃排出能と受容性弛緩の低下から起こると推測されているが、詳細な発症メカニズムは明らかではない。近年、カハールの介在細胞が消化管のペースメーカーであり、*in vivo* の消化管運動に重要な役割を持つことが分かっている。

【目的と方法】 糖尿病性胃腸症における消化管ペースメーカーの関与を検討するために、糖尿病自然発症モデル (NOD/LtJ) マウスの胃を用いて、1) 胃排出能、2) 内輪筋層の電気活性、3) Kit 陽性細胞の形態と分布、4) カハールの介在細胞 (ICC) の微細構造、の解析を行った。正常群として、糖尿病性胃腸症を発症していない同系マウス (未発症マウス) を用いた。疾患群として、腹部膨隆等により糖尿病性胃腸症と診断され、かつ高血糖値 (≥ 250) が確認されたマウス (胃腸症マウス) を用いた。

【結果】

- 1) 未発症マウスの胃排出能 (3 時間値) $94 \pm 2\%$ に対して、胃腸症マウスの同値は $45 \pm 16\%$ と、有意に低下していた ($p < 0.02$)。
- 2) 胃腸症マウスでは前庭部のスローウェイブが消失していた。また胃底部では、未発症マウスでは認められないスローウェイブ様の膜電位の変動が認められた。
- 3) 未発症マウスの前庭部では Kit 陽性細胞は網目状に分布し、胃底部では紡錘形であった。胃腸症マウスの前庭部では Kit 陽性細胞の網目は断裂し、胃底部では形態が変化した。
- 4) 胃腸症マウスの ICC は線維芽細胞に近い形態を示し、神経からやや離れていた。

【結論】 糖尿病性胃腸症に、消化管ペースメーカーと ICC の障害が関与している可能性が示された。

9. ミニブタにおける Sucralfate が血中 Clarithromycin 濃度と消化管機能に及ぼす影響

岩手大学・農・獣医外科¹, 中外製薬(株) 育成研究センター²

原 茂雄¹, 浅沼千佳子¹, 富澤 伸行¹, 櫻村 幸嗣², 星野 英一²

現在, *Helicobacter Pylori* (HP) 除菌を目的に, PPI に抗生剤 2 剤を用いる 3 剤併用療法が行われている。一方, 胃粘膜保護剤である Sucralfate (SF) を PPI に代えた 3 剤療法でも同等の除菌率が得られている。本研究では, ミニブタを用いて, 除菌に用いられる Clarithromycin (CAM) の血中濃度に対する SF の影響を胃液 pH, 消化管運動と併せて検討したので報告する。

【材料と方法】 供試動物としてミニブタ 5 頭を用いた。実験に先立ち, 採血のために頸静脈洞内へ, 投薬および胃液採取のために胃体部に各々静脈・胃カテーテルを留置した。さらに消化管運動を測定するために胃・小腸に force transducer を縫着して, CAM (10~50 mg/kg) 投与後の血中濃度, 胃液 pH・消化管運動を経時的に測定した。

【結果】 CAM 50 mg/kg 投与量の血中濃度において単独投与では 2773.7 ± 1826.4 ng/mL および SF (1 g/head) と CAM の併用投与では 4209.1 ± 1683.8 ng/mL と, 両者とも 2 時間で最高濃度に達し, 移行は SF 併用投与が高値を示しながら漸減した。また CAM 10 mg/kg 投与の CAM 単独投与では, 691.7 ± 679.1 ng/mL SF と CAM の併用投与では 884.8 ± 216.1 ng/mL と, 50 mg/kg 投与時と同様に SF 併用投与で高い傾向が認められた。胃液 pH 値は SF 投与により 15 分で pH 2.6 前後に上昇し, その後低下した。消化管運動においては SF と CAM 併用投与後 120 分で SF と CAM の併用投与が CAM 単独投与よりも軽度ながら亢進する傾向が認められた。

以上のことから, ミニブタにおいて CAM 単独投与よりも SF 併用投与において血中 CAM 濃度の上昇が認められ, SF の胃酸緩衝作用が関与する可能性が示唆された。

10. 幽門輪温存膵頭十二指腸切除モデル犬の術後上部消化管運動障害についての検討

東京慈恵会医科大学・外科学¹, 同・解剖学第一²

川崎 成郎¹, 中田 浩二¹, 中尾 誠利², 古川 良幸¹, 梶本 徹也¹, 向井 英晴¹
山本 尚¹, 高橋 朋子¹, 羽生 信義¹

【目的】 幽門輪温存膵頭十二指腸切除術 (PpPD) 後には経口摂取量も良好であり体重減少も少ないことから術後患者の QOL 向上に寄与する術式として知られている。しかし, 術後早期には胃内容停滞がしばしばみられ, 経鼻胃管留置期間の延長や入院の長期化などにより臨床上的問題となっている。PpPD 術後早期の消化管運動障害の病態については十分に解明されておらず不明な点も多い。今回われわれは PpPD モデル犬を作成し, 術後早期の消化管運動障害についての検討した。

【方法】 ビーグル犬 (n=4) を全身麻酔下に上腹部正中切開にて開腹し, 幽門輪の肛側約 2 cm で十二指腸を離断した後, 肛側断端を縫合閉鎖し離断部から約 3 cm の部位に端側吻合を行った PpPD モデル犬を作成した。胃体部, 胃幽門前庭部, 幽門輪, 十二指腸, 空腸の漿膜面に strain gauge transducer (SGT) を縫着し消化管運動の測定を行った。また, 単開腹 SGT を行い同様の位置に SGT を縫着した対照犬を作成した。PpPD 犬, 対照犬とも術後 1, 3, 7, 14, 28 日の空腹期消化管運動を測定した。

【結果】 PpPD 犬の空腹期強収縮は胃で術後 7 日には 2 頭, 14 日には 4 頭にみられ, 十二指腸では術後 14 日までみられなかった。対照犬ではいずれも術後 7 日に認められた。胃幽門前庭部における空腹期強収縮の胃の収縮と同期した幽門輪の弛緩 (gastro-pyloric coordination) は術後 7 日には 2 頭, 14 日には 4 頭に認められたが, 胃の収縮と同期した十二指腸運動の休止 (gastro-duodenal coordination) はみられなかった。対照犬の空腹期強収縮はいずれの部位でも術後 7 日には全ての実験犬にみられ, また, gastro-pyloro-duodenal coordination が認められた。

【まとめ】 PpPD 術後の胃内容停滞には, 空腹期強収縮の出現時期の遅延と gastro-duodenal coordination の障害が関与しているものと考えられた。

11. アルコール摂取が¹³C-octanoate および¹³C-acetate 呼気試験の¹³C 回収量(率)に及ぼす影響

川崎医科大学・内科学消化器 II¹, 広島大学・医・病態制御内科学²

楠 裕明¹, 春間 賢¹, 原 睦展², 眞部 紀明², 畠 二郎²

【背景, 目的】呼気試験は肝内の¹³C化合物の代謝は速やかでかつ一定であるという原則の上になり立っているが, 2000年のAGAでアルコール摂取が肝内の¹³C-octanoateの代謝を遅延させ,¹³CO₂として排出される¹³Cの量を低下させるという報告が見られた。今回われわれは日本人の健常人を対象に, アルコールが¹³C-octanoate および¹³C-acetate 呼気試験の¹³C回収量(率)に与える影響を検討した。【対象】¹³C-octanoate が13例, ¹³C-acetate が7例でいずれも健常人であり, 平均年齢は27歳であった。【方法】空腹期に sodium ¹³C-octanoate および¹³C-acetate (100 mg) で標識した水 100 ml を試験食として経口投与し呼気試験を行った。さらに同一対象に48時間以上の間隔を空け, 0.3 g/kg のウイスキー(40% ウイスキー平均 40 ml) を飲用させ, 30分後に試験食を投与して同様に呼気試験を行った。呼気試験は摂取前及び摂取後1時間までは5分毎, 1時間から2時間までを10分毎, 以後4時間までを30分毎に呼気を採取し, 赤外線分光器 U-bit 2000 で¹³CO₂濃度を測定した。¹³CO₂の回収量(率)は呼気排出速度曲線の area under the curve (AUC) 及び m 値で評価した。また15分後に体外式超音波を用いて試験食が胃から排出されていることを確認した。

【結果】¹³CO₂の回収量(率)は¹³C-octanoate でアルコール負荷前 AUC=45.95, m=0.487, 負荷後 AUC=38.94, m=0.438 であり¹³C-acetate でアルコール負荷前 AUC=42.07, m=0.435, 負荷後 AUC=42.82, m=0.453 であった。【考察】アルコールは肝内のβ酸化, TCA回路などの過程で¹³C-octanoate の代謝と重複しているが, TCA回路で重複する¹³C-acetate では回収量(率)に変化なく¹³C-octanoate で回収量(率)が低下することから, アルコールは肝内のβ酸化の過程で¹³C-octanoate の代謝と拮抗する事が予想された。

12. ¹³C呼気試験による胃排泄能検査—とくに胃切除後症例について—

日本大学・医・外科三

橋爪 正明, 佐藤 博信, 小林 秀昭, 田中 和彦, 宋 圭男, 高山 忠利

【目的】近年,¹³Cを用いた胃排泄能検査は非侵襲的であり, 簡便性などの点からその応用について様々な検討がなされてきている。胃切除後における胃排泄能を評価することは, 今後の再建術式の決定や合併症における指標として重要な因子となりうると考え, その第一段階として, 胃切除後の流動食における胃排泄能について検討した。

【対象と方法】対象は健常者11例, 幽門側胃切除術後症例5例で, 早朝空腹時に¹³Cacetate 100 mg を市販の液状バランス栄養食に混和したもの(総カロリー 200 kcal, 200 ml) を経口摂取してもらい, 摂取前および摂取後2時間までは10分毎に, 以後3時間までは15分毎に呼気を採取した。測定には UbiT-IR200 を, 解析は Microsoft Excel を使い, %dose/h の経時的変化および積算値について比較検討した。なお, 胃切除後症例は術後合併症のない症例とし, 愁訴もなく術後造影検査でも異常のない症例とした。

【結果】健常者においては個体差はあるものの, ほぼ近似した曲線を呈した。胃切除後症例では, 健常者に比較して Tmax が早期であったが, 以後の排泄には個体差が生じた。

【考察】検査食として, 液状のバランス栄養食を用いたが, 流動食の胃排泄能を評価するには簡便であると考えられた。健常者に比較して, 胃切除後の症例では, 流動食において排出先進が示唆されたが, さらに症例を重ね検討する必要があると考えられた。

13. ¹³C 呼気試験による胃排出測定—Prokinetics が胃排出動態に与える影響から分かるもの—

東海大学・医・消化器内科¹, 協和発酵工業株式会社医薬学術企画センター²
 済生会川口総合病院³, 海老名総合病院⁴

財 裕明¹, 高山 一郎¹, 高安 博之¹, 峯 徹哉¹, 野坂 千裕², 名越 淳人³
 原澤 茂³, 三輪 剛⁴

【目的】我々は「胃排出促進効果」という薬効で一括されているいくつかの prokinetics について、胃排出動態に与える影響の違いを検討することとした。【方法】既報のごとく、¹³C octanoic acid 100 mg を含有する、200 Kcal の自家製クッキーを試験食とした。健康人 50 名から得られたコントロールデータと、10 名ずつの健康人において、prokinetics 投与により得られたデータを比較検討した。prokinetics は domperidone 10 mg, itopride 50 mg, mosapride 5 mg, cisapride 2.5 mg を用いた。【成績】%dose/h で示される胃排出曲線で排出動態の変化を検討した。D₂ 受容体拮抗薬である domperidone と itopride は、試験食摂取直後より素早い排出速度の立ち上がりを示し、なおかつ最大の胃排出速度到達後に、特徴的な一過性の排出速度低下を認めた。5HT₄ 受容体刺激薬に分類される mosapride, cisapride の効果は、D₂ 受容体拮抗薬に比し、排出速度の上昇は緩やかであったものの試験終了時まで持続する傾向を示した。【結論】D₂ 受容体拮抗薬は胃の壁内コリン作動性神経における、dopamine 受容体を介した、アセチルコリン放出抑制作用を解除する事で消化管運動賦活作用を發揮しているが、上部小腸へのカロリー負荷で発生する caloric-feedback regulation (duodenal brake) の影響をより強く受けると推察された。また、この現象は個人差が非常に大きく、胃排出速度の高低だけでは説明できない個々の gastrointestinal accommodation の有り様を反映しているとも考えられた。一方 5HT₄ 受容体刺激薬は、コリン作動性神経からのアセチルコリン放出を、より亢進させる事で消化管運動賦活作用を發揮しており、このアセチルコリン放出における「亢進」と「抑制の解除」の違いが、胃排出動態の差となって現れるのではないだろうか。

14. ¹³C 呼気試験に関する基礎的検討

東北大学・医・消化器病態学¹, 同・医・情報科学研究科²

北川 靖¹, 大原 秀一², 下瀬川 徹¹

【目的】胃排出能を測定する ¹³C 呼気試験法について様々な報告がなされているが、使用する試薬、試験食、評価指標などが統一されてはおらず、他施設の成績との比較が困難なのが現状である。試薬として sodium ¹³C-octanoate (以下 OC) や sodium ¹³C-acetate (以下 AC) があるが、以前より我々は OC を用いた場合 half-emptying time (以下 T1/2) は ¹³C の総排泄率 (以下 *m*) と相関し、胃排出能以外の吸収・代謝・排泄の影響が大きい可能性があることを報告してきた。今回我々は健康者に対し AC を用いた呼気試験を行い、T1/2 と *m* との関係について検討した。また他の評価指標として計算上の peak time (Tpeak) および実測上の最初の peak point (以下 Tmax) を用い、より簡略化した定性的検査法の可能性についても検討した。【方法】検討 ①: 対象は健康者ボランティア 11 名。試薬として AC 100 mg, 試験食はラコールを用い T1/2 と *m* の関係について検討した。検討 ②: 対象および検査法は検討 ①と同様で、胃排出遅延のモデルとして scopolamine butylbromide (以下 SB) 20 mg を筋注し、評価指標として Tpeak を用い検討 ①の結果と比較した。また、呼気採取回数を減らし Tmax を用いて定性的に SB 投与を識別できるかどうか検討した。【結果】検討 ①: T1/2 と *m* との間には相関を認めなかった (R=0.46)。検討 ②: 検討 ①および SB 投与時の Tpeak の mean±SD はそれぞれ 51.9±8.5 分, 77.0±11.8 で SB 投与時に有意に延長していた。また Tpeak と Tmax の間には強い相関を認めた (R=0.92)。そこで呼気採取時間を検討 ①の平均付近である 30~90 分とし、評価指標として Tmax を用い、Tmax ≤ 50 分を正常、Tmax ≤ 60 分を遅延とすると、SB 投与による胃排出遅延の識別に関しては sensitivity 90.0%, specificity 95.0% であった。【結論】AC は *m* との相関がなく、OC に比べて吸収・代謝・排泄の影響が少ないと推測され、より適切な試薬と考えられた。また評価指標として特別な計算を必要としない Tmax を用い、呼気採取回数を健康者の平均付近に限定することにより、今まで以上に簡便に胃排出遅延患者を拾い上げることが可能と考えられた。

15. ¹³C 呼気試験法胃排出能検査において代謝排泄能の個体差を補正する新しい評価法の試み

東京慈恵会医科大学・外科学

中田 浩二, 羽生 信義, 川崎 成郎, 高橋 朋子, 梁井真一郎, 梶本 徹也
古川 良幸, 山本 尚, 向井 英晴

¹³C 呼気試験法胃排出能検査 (¹³C 法) は非侵襲的で簡便な新しい胃排出能検査として本邦でも急速に広まりつつある。しかし、RI 法のような直接法とは異なり、間接法であるために胃排出速度以外にも ¹³C 標識化合物の代謝排泄能に影響されること、代謝排泄能の個体差を補正する方法がないこと、などが問題とされてきた。

「目的」今回われわれは、¹³C 法において代謝排泄能の個体差を補正し胃排出能検査としての信頼性を高めるための新しい工夫をしたので報告する。

「方法・結果」健康人被験者 6 名に、Ghoos らの試験食に準じて ¹³C-octanoic acid 100 mg と ^{99m}Tc-DTPA 40 MBq を卵黄に添加し白味とは別に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 を投与した。呼気採取とガンマカメラによる撮影を摂取後 6 時間まで 15 分毎に行った。今まで、呼気中 ¹³CO₂ 存在率曲線における Tmax とバイオアベイラビリティの概念を導入した胃内残存率の算出法 (retention rate % = 1 - AUC_x/AUC_{infinity}) を考案し報告してきたが、呼気中 ¹³CO₂ 存在率曲線の消失相の傾きは代謝排泄能の個体差により変動するため従来法では胃排出速度以外の要因に影響されることが問題であった。そこで、消失相の影響を除くために胃内残存率を (retention rate % = 1 - AUC_x/AUC[Tmax]) として算出し RI 法との相関性を検討したところ、従来法と比べてより強い相関が認められた。

「結語」¹³C 法において代謝排泄能の個体差を補正することにより、より信頼性の高い胃排出能検査とすることが可能と考えられた。

16. 内圧法による排便時の結腸、直腸、内肛門括約筋の協調運動の観察

聖路加国際病院・小児外科

松藤 凡, 横山穰太郎

排便には、直腸内肛門括約筋抑制反射、外肛門括約筋や骨盤底筋群の弛緩と収縮、直腸肛門角、腹圧など多くの要因が関わっており、このため排便は直腸肛門に局限した現象として取り扱われてきた。しかし、force strain gauge transducer を用いたイヌにおける自然排便時観察から、以下の 3 つの特徴的な運動パターンが存在することを報告してきた。

- 1) GMC が直腸または内肛門括約筋まで伝播する。
- 2) 直腸では収縮に先立って弛緩が出現する。
- 3) 内肛門括約筋が弛緩する。

これらの観察結果から、排便は直腸が収縮して内肛門括約筋が弛緩するといった単純なものではなく、結腸から始まり直腸、肛門括約筋に至る一連の協調運動の結果であることが判明した。

今回は、臨床例においてグリセリン注腸にて誘発した排便時の結腸、直腸、肛門の運動を内圧法を用いて観察がしたので報告する。

排便時には、巨大収縮波 (High Amplitude Propagated Contraction) が、結腸から直腸または内肛門括約筋まで伝播する。この間内肛門括約筋は弛緩し便が排泄される。収縮が直腸まで到達すると排便は終了する。

これらはイヌにおける自然排便時の運動と類似しており、臨床例において排便障害の病態を解明するうえで有用と考えられる。

17. モサプリドによる排便反射(直腸一直腸反射と直腸一内肛門括約筋反射)に対する促進効果

奈良県立医科大学・第一外科学¹, 同・第二生理学²

島谷 英彦¹, 門脇 真², 中川 正¹, 藤井 久男¹, 中島 祥介¹, 高木 都²

【目的】モサプリド(M)は選択的5-HT₄受容体作動薬として,主に上部消化管に対する運動促進剤として使用されている。5-HT₄受容体のヒトの結腸,直腸における存在が知られており,下部消化管に対する作用,特に排便反射に対する作用に注目した。【方法】モルモットをウレタン麻酔下にガラムミンで非動化し人工呼吸後,直腸へ挿入したバルーンを5分間加圧伸展することによって誘起された直腸の反射性収縮反応と内肛門括約筋(IAS)の反射性弛緩反応を記録した。M投与前に両者の反応を記録しCONTROLの反応とし,続けてMの投与量を段階的に増やしながら静注し,同様の記録を行った(無侵襲群:n=20)。さらに腰髄,仙髄を破壊して腸壁内神経系のみを残したモルモットを作製し,腸壁内神経系を介する反応のみに焦点を絞り,同様の実験を行った(腰・仙髄破壊群n=23)。【結果】両群のCONTROLの反応として直腸加圧伸展に伴って直腸に起こる数回の反射性収縮とほぼ同期してIASに数回起こる反射性弛緩が認められた。両反射の定量的評価法として直腸一直腸反射はarea under the curve(AUC)を,直腸-IAS反射はarea over the curve(AOC)を用いた。M投与前のAUCとAOCを1として投与後のAUC,AOCを比率として求めreflex index(R.I.)として比較検討した。Mを投与すると直腸一直腸反射のR.I.は無侵襲群では0.5 mg/kg,1.0 mg/kg,腰・仙髄破壊群では1.0 mg/kg,2.0 mg/kgで用量依存性に有意な増加を認めた。一方,直腸-IAS反射において無侵襲群では0.1 mg/kg,1.0 mg/kg,腰・仙髄破壊群では5.0 mg/kgで有意な増加を認めた。5-HT₄受容体遮断薬GR-113808 1.0 mg/kg静注によりMの両反射に対する促進効果は拮抗された。【考察と結論】M投与により排便反射の重要な構成要素である直腸一直腸収縮反射と直腸-内肛門括約筋弛緩反射の5-HT₄受容体を介する亢進作用が認められ,5-HT₄受容体刺激による統合的な排便機能の増強が示された。

18. アルファ2受容体拮抗剤 yohimbine の結腸運動亢進・排便誘発作用とその機序

東北大学・医・生体調節外科¹, 同・医・消化器外科²

柴田 近¹, 内藤 広郎¹, 金 学林¹, 長尾 宗紀¹, 舟山 裕士¹, 福島 浩平¹
橋本 明彦¹, 松野 正紀², 佐々木 巖¹

【目的】交感神経系,特にアルファ2受容体の結腸運動制御における役割について検討すること。【方法】体重13-16 kgの雑種成犬を用い,十二指腸,回盲弁から10,20 cmの回腸,結腸5カ所,の計8カ所に消化管運動測定用のstrain gauge force transducerを縫着した。2週間の回復期間の後,意識下で消化管運動を測定した。十二指腸運動が空腹期パターンを示している時期に,yohimbine 0.5,1.0,3.0 mg/kgを静脈内投与し,回・結腸運動,排便に対する効果を検討した。また,yohimbine 3.0 mg/kgの結腸運動亢進効果に対するatropine(ムスカリン受容体拮抗剤,0.1 mg/kg+0.1 mg/kg-h),hexamethonium(ニコチン受容体拮抗剤,5 mg/kg+10 mg/kg-h),FK224(neurokinin 1受容体拮抗剤,1 mg/kg+1 mg/kg-h),ondansetron(セロトニン3受容体拮抗剤,1 mg/kg+1 mg/kg-h)の影響を検討した。【結果】yohimbineは,どの用量でも,対照に比べて回・結腸運動の亢進を引き起こしたが,運動亢進の程度に用量依存性は認められなかった。Yohimbine投与後30分以内の排便誘発率は,0.5,1.0,3.0 mg/kgでそれぞれ,80,20,60%であった。また,波高が高く伝播速度の速いgiant migrating contractions(GMCs)の誘発率は0.5,1.0,3.0 mg/kgでそれぞれ,100,20,67%であった。GMCsが中部結腸までしか伝播しないときには排便を誘発しなかったが,遠位結腸まで伝播したときには排便を誘発した。atropineとhexamethoniumは,このようなyohimbineの回・結腸運動亢進効果を完全に抑制した。Ondansetronにも抑制効果は認められたものの,atropineとhexamethoniumに比べて弱かった。FK224はyohimbineの回・結腸運動亢進効果に影響しなかった。【結語】アルファ2受容体が結腸運動,特に排便の制御に対して抑制的な生理的役割を担っている可能性が示された。

19. ラット腸管における capsaicin (vanilloid) receptor (VR1) の局在—生理機能との関連で—

奈良県立医科大学・第二生理¹, 京都工芸繊維大学・繊維・応用生物学²
富山医科薬科大学・薬・薬品作用学³

門脇 真¹, 藏本 博史², 山崎 夏維¹, 橋本 裕子¹, 倉石 泰³, 高木 都¹

[目的] ラット腸管における capsaicin (vanilloid) receptor (VR1) の局在, 性質について, 生理学的, 組織学的および分子生物学的に明らかにする. [方法] ラット (Wistar 系雄性 7 週齢) の空腸, 回腸, 近位側結腸および遠位側結腸を摘出し, atropine (3 μ M) および guanethidine (3 μ M) を含む Tyrode 液中で縦走筋方向に懸垂した. ついで, 1) capsaicin (1 μ M) の効果, 2) その効果に対する VR1 拮抗薬 capsazepine と ruthenium red の効果を検討した. 3) ラット VR1 C 端抗体を用いて VR1 の腸管での存在部位を検討した. 4) RT-PCR により, VR1 mRNA の腸管での存在について検討した. [結果] 空腸で capsaicin (1 μ M) は弛緩反応を起こした. しかし, capsaicin (1 μ M) 2 回投与により VR1 を脱感作しても, フィールド刺激による弛緩反応および腸間膜動脈神経刺激による弛緩反応は変わらなかった. 近位側結腸では capsaicin (1 μ M) は弛緩反応をほとんど起こさず, 自発性の縦走筋方向の律動収縮を強く抑制した. そして, これらの capsaicin による空腸の弛緩反応と近位側結腸の律動収縮の抑制反応は, capsazepine (10 μ M) および ruthenium red (3-10 μ M) の前投与で強く抑制され washout により capsaicin の効果は再出現した. 続いて投与した capsaicin は抑制性反応を起こさず, capsaicin による脱感作が観察された. しかしながら, capsaicin (1 μ M) は回腸および遠位側結腸においては明らかな反応を起こさず, VR1 の部位特異性が示唆された. さらに, 空腸および近位側結腸の筋層間神経叢および粘膜下神経叢の whole mount 標本での VR1 C 端抗体を用いる免疫組織化学的検討で, 粘膜下神経叢と筋層間神経叢には varicosity を持った VR1 陽性神経線維が認められたが, VR1 陽性反応を示す壁内神経細胞は神経節には見られなかった. また, RT-PCR による VR1 mRNA の部位別の検討では, 近位側結腸には後根神経節と同じ位置に VR1 mRNA のバンドを検出したが, 回腸, 遠位側結腸では認められなかった.

20. 水浸拘束ストレスによるラット大腸内圧の変化に関する検討

弘前大学・医・第一内科, 同・保健管理センター²

佐藤 研¹, 瀧本美耶子¹, 佐々木大輔²

消化管機能の検討のために様々なストレス負荷や薬物負荷が考案されているが, 寒冷ストレスによる大腸運動の変化を検討した発表も散見される. 今回我々は, 大腸機能異常の検討を目的として, 急性潰瘍モデルとして広く用いられている水浸拘束ストレス負荷を応用し, ストレス条件下でのラット大腸内圧の変化, 及び薬物の影響について検討した.

[方法] S-D 系ラット 20 匹 (雄 10 匹, 体重 550-600 g, 雌 10 匹, 体重 250-300 g) を用い, 24 時間絶食後実験を行った. エーテルにて麻酔後, 圧トランスジューサーである MIKROTIPI を経肛門的に挿入し, distal colon に固定した. その後ネットにてラッピングし拘束した状態で意識下に 60 分間内圧を記録した. その後に 60 分間剣状突起の高さまで水に浸し, 同様に内圧の測定を行った. 大腸内圧はペンレコーダーにて内圧曲線として記録した. また水温は 23°C とし, 同一個体に対して拘束後水浸を 2 回くり返した後, 水温を 30°C とし同様に拘束後水浸を 1 回行った. 3 回の実験はそれぞれ別の日に絶食後に行った. 負荷前後の内圧曲線より 5 分ごとに motility index (MI) を計測し, 評価した. また麻酔下及びアトロピン投与後に水浸拘束負荷を行い比較検討を行った.

[結果, 考察] 23°C の水浸拘束負荷後, 著明に MI は増加した. アトロピン投与後水浸拘束したラット群では抑制されたことから, アーチファクトによる影響は少ないと思われた. IBS ではストレスにより症状の悪化があり, また便秘型においては, distal colon の内圧の亢進を認めることから, 水浸拘束ラットが IBS モデルとなりうる可能性について, 今後検討したい.

21. 培養結腸紐平滑筋細胞における angiotensin II による Ca^{2+} シグナリングと ATP 放出

福岡大学・医・薬理学¹, 同・薬・薬理学²

桂木 猛¹, 佐藤千江美¹, Lou Guangyuan¹, 本多 健治²

本研究の目的は angiotensin II (Ang II) による平滑筋培養細胞からのオートクリン/パラクリンとしての ATP の放出に関する細胞内シグナル系を明らかにすることである。

【方法】 培養細胞を灌流し、アゴニスト刺激により放出された液中の ATP を luciferase 法により、また細胞内 $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ はラジオレセプターアッセイによりそれぞれ測定された。

【結果】 本実験で AngII は $0.3\text{-}1 \mu\text{M}$ でコントロールの約 8 倍の著明な ATP 放出作用を示したが、ヒト fibroblast cell line に Ang II $10 \mu\text{M}$ を投与しても何ら ATP 放出変化は見られなかった。この Ang II による ATP 放出は AT2 アンタゴニストの PD123319 では全く影響されず、AT1 アンタゴニストの $10 \mu\text{M}$ SC52458 により完全に拮抗された。さらにこの ATP 放出は phospholipase C 阻害薬の $10 \mu\text{M}$ U-73122 や Ca^{2+} -ATPase 阻害薬の $0.5 \mu\text{M}$ thapsigargin さらに細胞内 Ca^{2+} キレーター BAPTA により、いずれも著しく拮抗された。Ang II は培養細胞において早い立上りの著しい $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ の産生増加を引起し、これは AT1 アンタゴニスト前投与により完全に拮抗された。

以上の結果より、Ang II による培養細胞からの ATP 放出には小胞体の $\text{Ins} (1, 4, 5) \text{P}_3$ 受容体系の Ca^{2+} シグナルが関与するものと考えられる。

22. モルモット結腸紐のカルバコール収縮に対する Y-27632 の効果

九州大学・医・小児外科

家入 里志, 水田 祥代, 中辻 隆徳

【目的】 Rho kinase 阻害薬である Y-27632 は特異的に Rho kinase を抑制し、 Ca^{2+} 感受性を下げることで平滑筋を弛緩させる。本研究ではモルモット結腸紐を用いて消化管平滑筋のカルバコール収縮に対する Y-27632 の作用を検討した。

【方法】 Fura-PE3 表面蛍光測光法を用いてモルモット結腸紐平滑筋条片の細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 変化と発生張力を同時測定した。いずれも非刺激時 (5.9 mM K^+) を 0%, 60 mM K^+ 脱分極刺激時を 100% として相対的に表した。実験はテトロドトキシン ($1 \mu\text{M}$) 存在下で行った。

【結果】 1) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 は $10 \mu\text{M}$ カルバコール刺激による持続 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び発生張力を $64.4 \pm 8.8\%$, $18.7 \pm 6.0\%$ と優位に抑制した。2) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 は 60 mM K^+ 脱分極による持続的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇には影響を与えなかったが発生張力を $50.5 \pm 6.1\%$ と優位に抑制した。3) $30 \mu\text{M}$ Fasudil は $10 \mu\text{M}$ カルバコール刺激による持続 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び発生張力を $69.6 \pm 7.4\%$, $13.2 \pm 7.5\%$ と優位に抑制した。4) $10 \mu\text{M}$ Y-27632 及び $30 \mu\text{M}$ fasudil によるカルバコール刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇及び発生張力の抑制効果は 40 mM K^+ で消失し、さらに $10 \mu\text{M}$ Y-27632 による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の抑制効果は Apamin 存在下で消失した。

【総括】 モルモット結腸紐平滑筋のカルバコール収縮には Rho kinase による Ca^{2+} 感受性上昇機構が関与し、Y-27632 が抑制効果をもつと考えられた。また Rho kinase は一部の K チャンネルの調節に関与していると考えられた。

23. トロポニン I 抑制領域由来 inhibitory peptide による盲腸紐スキンド標本収縮抑制

東京医科大学・生理学第一¹, 九州大学・医・臨床薬理学²

吉野 恭正¹, 渡辺 賢¹, 森本 幸生²

平滑筋細胞における細いフィラメント側収縮制御機構の実体を明らかにする目的で, モルモット盲腸紐 β エスシン処理スキンドファイバー収縮に対するトロポニン I の抑制領域 (残基 104-115) 合成ペプチド (inhibitory peptide; IP) の効果を検討した。横紋筋同様に, IP は数 100 μ M で盲腸紐の Ca イオン活性化収縮張力発生を可逆的に抑制した。一方, 予め Ca イオンで収縮させた標本に IP を加えたときには, その抑制効果は減弱した。又, IP は弛緩速度には殆ど影響しなかった。IP による収縮抑制時にミオシン軽鎖リン酸化の程度の抑制はみられなかった。又, IP の収縮抑制効果は, ATP γ S でミオシン軽鎖をチオリン酸化した後に, リン酸化反応の基質にはなりにくいミオシン ATPase の基質としては働く CTP で活性化した標本でも観察された。更に, IP は高 Mg(+) CTP により惹起されるミオシン軽鎖リン酸化非依存性収縮も可逆的に抑制した。以上の結果から, IP はミオシン軽鎖リン酸化・脱リン酸化過程ではなく, 細いフィラメント側に直接働きミオシン・アクチンの結合を阻害することによって盲腸紐収縮を抑制することが示唆された。

24. 盲腸紐スキンド標本収縮に対する heat shock protein 20 由来ペプチド (HSP20₁₁₀₋₁₂₁) の効果; inhibitory peptide との比較

東京医科大学・生理学第一¹, 九州大学・医・臨床薬理学²

渡辺 賢¹, 吉野 恭正¹, 森本 幸生²

平滑筋細胞に存在する heat shock protein 20 (HSP20) はアクチン結合能を持ち, cGMP 依存性弛緩反応に関与すると考えられている。最近, HSP20 にトロポニン I の抑制領域 (残基 104-115) 合成ペプチド (inhibitory peptide; IP) と高い相同性を持つアミノ酸配列が存在し, その合成ペプチド (HSP20₁₁₀₋₁₂₁) は豚頸動脈をトリトン処理して作成したスキンドファイバーの Ca イオン活性化収縮を抑制することが明らかになった (Rembold CM et al. J Physiol 524; 865-878, 2000)。HSP20₁₁₀₋₁₂₁ の平滑筋収縮抑制機序を明らかにする目的で, 盲腸紐 β エスシン処理スキンドファイバー収縮に対する HSP20₁₁₀₋₁₂₁ と IP の影響を比較検討した。HSP20₁₁₀₋₁₂₁ は Ca イオン活性化収縮や高 Mg(+) CTP によるミオシン軽鎖リン酸化非依存性収縮を僅かに抑制するが, その抑制の程度は IP に比べて少なかった。一方, HSP20₁₁₀₋₁₂₁ は IP と異なり弛緩速度を有意に延長した。以上の結果から, HSP20₁₁₀₋₁₂₁ にはアクチンとミオシンの解離を妨げるという, IP にはない作用を持つことが示唆された。

25. ラット門脈縦走筋の自発収縮に対するアルギニンの作用について

北海道医療大学・薬・臨床薬理毒理学¹, 北海道大学・医・病態解析学², 近畿大学・薬・機能形態学³

木村 真一¹, 鳥羽美由起¹, 周 明¹, 島村 佳一¹, 川口 秀明², 関口富美子³
砂野 哲³

先の平滑筋学会総会で、ラット門脈の輪状筋標本におけるアルギニンの収縮促進作用のについて報告した。今回は、ラット門脈の縦走筋標本をもちいて、アルギニン収縮促進機序について検討した。麻酔ラットより門脈縦走筋を摘出し、タイロード液中で等尺性張力を測定した。規則的な自発収縮を示す標本は、 10^{-4} ~ 10^{-2} M の L-アルギニンで収縮頻度が増加した。収縮高や収縮持続時間には著しい変化はみられなかった。D-アルギニンは自発収縮をほとんど変化させなかった。L-ニトロアルギニンは自発収縮に影響を与えなかった。L-ニトロアルギニン存在下においても、L-アルギニンは自発収縮頻度を増加させた。蛍光色素を用いた細胞内遊離 Ca 濃度の測定において、自発収縮にもなって細胞内遊離 Ca 濃度の上昇がみられた。L-アルギニンは細胞内遊離 Ca 濃度の上昇の頻度を増加させた。微小電極法による膜電位記録により活動電位数の増加が観察された。

以上より、ラット門脈縦走筋の自発収縮に対する L-アルギニンの収縮促進作用には、活動電位発生の増加が関与することが示唆された。

26. ウサギ血管および血小板に対する新規トロンボキサン A₂ 受容体遮断薬 Z-335 の作用

東北大学・薬・細胞情報薬学

吉田 真, 志村 徳郎, 佐藤ゆかり, 大久保聡子, 中畑 則道

トロンボキサン A₂ 受容体 (TP) の薬理学的な性質は血管と血小板で異なることが以前から報告されている。しかし、その実体については現在のところ明らかではない。本研究では、新規 TP アンタゴニストである Z-335 ((±)-sodium[2-(4-chlorophenylsulfonylaminoethyl)indan-5-yl]acetate monohydrate) のウサギ大動脈血管平滑筋と血小板における TP に対する作用について検討を加えた。

TP アゴニストの U46619 は血小板の形態変化と凝集を引き起こし、 pD_2 値はそれぞれ 7.93 および 6.26 であった。Z-335 は U46619 による凝集反応を抑制したが、その抑制形式は非競合的であった。一方、U46619 による血小板の形態変化に対して Z-335 は競合的に抑制し、その pA_2 は 8.06 であった。また、TP アンタゴニスト [³H]SQ29548 の結合を Z-335 は用量依存的に抑制し、その pKi 値は 7.85 であった。Z-335 は血小板において U46619 によるイノシトールリン脂質 (PI) 水解反応も抑制した。一方、U46619 はウサギ大動脈血管平滑筋を用量依存的に収縮させ (pD_2 7.34)、その収縮は Z-335 によって競合的に抑制された (pA_2 8.60)。Z-335 は他の受容体刺激による血管収縮反応を抑制せず、その作用は TP 受容体に特異性が高いものと考えられた。また、その作用の特徴として受容体から解離しにくい薬物と考えられた。初代培養血管平滑筋細胞では、U46619 によって引き起こされる PI 水解反応を Z-335 は用量依存的に抑制し、また [³H]SQ29548 の結合も用量依存的に抑制した (pKi 8.78)。以上の結果より、Z-335 は血管および血小板における TP をともに強力に遮断するが、その抑制に要する濃度は血管の方が血小板に比べて低濃度であることから、Z-335 は血管と血小板の TP の相違を認識しているものと考えられる。

27. 正常血圧と高血圧自然発症ラット大動脈のカフェインによる弛緩反応の比較

近畿大学・薬・機能形態学

関口富美子, 三宅 義雅, 樫本 孝史, 砂野 哲

カフェインは血管標本を弛緩させるが, この弛緩には内皮依存性の部分があるという報告がみられる。また, 高血圧動物の血管では内皮依存性弛緩に異常があることも知られている。本研究では, カフェインによる弛緩反応を正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) と脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット (SHRSP) の大動脈を用いて比較, 検討した。ノルアドレナリンで前収縮させた標本のアセチルコリンによる内皮依存性弛緩は WKY 標本に比べ SHRSP 標本で著明に減弱していたが, カフェインによる弛緩は標本間で差はなかった。どちらの標本においてもカフェインによる弛緩は内皮除去の影響をほとんど受けなかった。膜透過型の安定なサイクリック AMP (cAMP) のアナログである $N^6, 2'-O$ -dibutyryladenosine $3': 5'$ -cyclic monophosphate (db-cAMP) による弛緩反応も WKY, SHRSP 標本間で差はみられなかった。大動脈平滑筋の細胞内 cAMP レベルを測定したところ, 非刺激条件下, ノルアドレナリン存在下, ノルアドレナリンとカフェイン存在下の全ての条件下において SHRSP 標本の cAMP レベルは WKY 標本より有意に高い値を示した。カフェインはどちらの標本の cAMP レベルも増加させたが, その増加量は標本間で差はみられなかった。以上より, ラット大動脈におけるカフェイン弛緩には内皮由来弛緩因子は関与しておらず, カフェインの血管平滑筋に対する直接的な作用によるものであること, また, このカフェインの作用は SHRSP 標本において変化がないことがわかった。db-cAMP に対する感受性に WKY, SHRSP 標本間で差がなかったことから, cAMP に対する感受性も標本間で差はないと考えられるが, 基礎的な cAMP レベルが SHRSP 標本で上昇していた結果についてはさらに検討が必要と思われる。

28. ラット腹部大動脈における Atypical β -アドレナリン受容体を介した弛緩反応の特徴

東邦大学・薬・薬理学

松下真由美, 堀之内孝広, 田中 芳夫, 小池 勝夫

【緒言】 β -アドレナリン受容体 (β -AR) は従来, β_1 -AR 及び β_2 -AR に細分類されていたが, 現在では β_1 -AR 拮抗薬や β_2 -AR 拮抗薬によって拮抗されにくいという特徴を有する Atypical β -AR (β_1 -AR あるいは β_2 -AR 以外のサブタイプ) もしくは β_3 -AR (便宜上, 3種のサブタイプに分類されることから) の存在が明らかにされている。本研究では, ラット腹部大動脈に機能的な Atypical β -AR が存在していることを明らかにし, Atypical β -AR を介した弛緩反応の特徴を検討したので報告する。

【方法】 Wistar 系雄性ラット (6~8 週齢) を撲殺瀉血後, 直ちに腹部大動脈を摘出し, 血管内皮を除去したらせん標本を作成した。筋の機械的反応は 1g の負荷の下, 等尺性に記録した。 β -AR を介した反応は, (-)-Phenylephrine (0.3 μ M) で収縮させた標本に β -AR 作用薬を累積投与することにより観察した。なお, β -AR 拮抗薬の処理時間は 60 分間とした。

【結果及び考察】 (-)-Isoprenaline 及び (±)-CGP12177A (non-conventional atypical β -/ β_3 -AR 作用薬) による弛緩反応は, CGP20712A (0.1 μ M, 選択的 β_1 -AR 拮抗薬) 及び ICI-118,551 (0.1 μ M, 選択的 β_2 -AR 拮抗薬) による拮抗作用に抵抗性であった。CGP20712A (0.1 μ M) 及び ICI-118,551 (0.1 μ M) 共存下, (-)-Isoprenaline 及び (±)-CGP12177A の濃度反応曲線は, SR59230A (0.1~1 μ M, 選択的 β_3 -AR 拮抗薬) によって影響を受けなかったが, (±)-Bupranolol (3~10 μ M, 非選択的 β_1 -, β_2 -, Atypical β -/ β_3 -AR 拮抗薬) によって濃度依存的に右方へ移動した。しかしながら, 30 μ M の (±)-Bupranolol 処理によってそれ以上の移動は観察されなかった。これらの知見から, ラット腹部大動脈における β -AR を介した弛緩反応には, β_3 -AR とは異なる Atypical β -AR が関与しており, Atypical β -AR を介した弛緩反応は, (±)-Bupranolol 感受性及び非感受性という 2つのタイプがある可能性が示唆された。

29. テレメトリー法測定による低体温過程ラットの血圧変動のスペクトル解析

国立療養所秋田病院¹, 秋田大学・工学資源²

猪又 八郎¹, 井上 浩², 布施 力恵²

〔目的〕 テレメトリー法を用い, 無麻酔無拘束状態のラットで冷却環境下の血圧変動を測定し, 低体温過程の自律神経活動の関与について検討した。

〔対象と方法〕 使用ラットは Sprague Dawley (SD) 系, 21~28 週齢, 体重 415~470 g である。生体電位, 温度両信号の送信機と受信機からなるテレメターシステムは Data Sciences 製 (Mutiplus TL11M2-C50-PXT) を使用した。腹腔内深部に装着した送信機部位の温度 (T_r) を, カテテルを挿入した下行大動脈の血圧 (BP) をそれぞれ測定し所定の深部温度 ($T_r=38\sim30^\circ\text{C}$), 収縮期血圧 (SBP) を記録した。冷却環境として冷凍庫を利用し, 対象ラットを無拘束下で庫内に解放し庫内温度を環境温度 (T_a) として評価した。庫内の冷却暴露後 12 時間, 解除後復温過程 10 時間にわたり T_r に対する SBP および SBP の時間間隔 (SBPi) を連続的に測定し, 2 つの変動の周波数分析を行った。

〔結果〕 $T_a=23^\circ\text{C}$, $T_r=38^\circ\text{C}$ では SBPi=0.18 sec, SBP=150 mmHg が冷却暴露により一時的に 0.14 sec の短縮, SBP=158 mmHg の上昇に急変後, $T_r=36^\circ\text{C}$ から 30°C まで体温下降過程で SBP の低下と SBPi の延長がみられた。体温復温過程ではヒステリシス現象がみられた。周波数解析により求められた Very Low Frequency (VLF), Low Frequency (LF), High Frequency (HF) の 3 成分の瞬時振幅 VLFA, LFA, HFA は 38°C から冷却暴露により抑制減少するが低体温過程で LFA, HFA が 34°C 近傍から増加傾向を示し, 特に HFA ではこの傾向がより顕著であった。以上の知見からラットの低体温過程では交感神経系の抑制に対して, 副交感神経系緊張の優位の可能性が暗示された。

30. 培養血管平滑筋の収縮能に及ぼす活性酸素の影響—*in vitro* モデル血管を用いた検討—

九州大学・医・生体情報薬理学

大池 正宏, 木村 千稚, 辛島 裕士, 久留 和成, 伊東 祐之

酸化ストレスは動脈硬化や高血圧などの心血管病変の原因として重要であるが, その血管収縮に及ぼす影響については不明の点が多く残されている。我々は, 培養ウシ大動脈平滑筋細胞 (BASMC) に及ぼす活性酸素 (O_2^-) の効果を, 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 測定と *in vitro* モデル血管を用いて検討した。xanthine (X) と xanthine Oxidase (XO) を 37°C で反応させて O_2^- を発生させ, 細胞を 45 分間曝露した。コラーゲンコートした培養プレートに BASMC を培養して O_2^- に曝露したところ, ATP による P_2 受容体刺激で生じる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇と, thapsigargin 刺激によって惹起される容量性 Ca^{2+} 流入の両者が有意な減少を示し, これらは superoxide dismutase (SOD) によって回復した。これに対し, 高 K^+ 溶液による脱分極で生じる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は, O_2^- によっても影響を受けなかった。一般に平滑筋細胞は培養によってその収縮力を失うが, BASMC をコラーゲングル内に包埋して 24 穴培養プレートに培養したところ, これらの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇刺激によってゲルの収縮がみられた。そこで我々は, これをデジタルカメラで経時撮影したのちにゲル表面積を計算することで平滑筋収縮の *in vitro* モデル系として使用した。このコラーゲングルに上記の O_2^- 曝露を行なったところ, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の低下がみられた ATP と thapsigargin による刺激に対する収縮は抑制を認め, これらは $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の場合と同様に SOD によって回復した。ところが, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ には影響を認めなかった高 K^+ 溶液による収縮も O_2^- によって有意に抑制され, さらに, Ca^{2+} イオノフォア A23187 によって生じる収縮も O_2^- によって有意に抑制された。これらも SOD によって回復した。以上の結果より, O_2^- は血管の収縮能を低下させ, これは一部の Ca^{2+} 動態の抑制に加えて血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性の低下にもよっていることが示唆された。

31. ラット腸間膜動脈末梢部に存在する高電位活性化型ジヒドロピリジン (DHP) 非感受性 Ca^{2+} チャネルの T 型 Ca^{2+} チャネルに類似した薬理学特性について

九州大学・医・生体情報薬理学

井上 隆司, 森田 浩光, 伊東 祐之

全身の血管系には L 型チャネルが普遍的に分布し、血管の抵抗（緊張度）の調節に中心的な役割を果たしていると考えられてきた。しかし最近の研究から、細動脈以降の末梢抵抗血管部には、幾つかの DHP 非感受性 Ca^{2+} チャネルの isoform が部位特異的な分布をしていることが明らかになってきた。腸間膜動脈末梢部でも、従来の電位依存性 Ca^{2+} チャネルとは異なる性質を示す Ca^{2+} チャネル (NICCs) が種を越えて存在することが報告されているが、その分子実体を知るための必須の情報がかかり不足している。そこで本研究では、このチャネルに似た電気生理学的性質を示すことが示唆されている R-型、T-型 Ca^{2+} チャネルに対応する遺伝子、 $\alpha 1E$, $\alpha 1G$ を安定発現した細胞を用いて、3 つの Ca^{2+} 電流の電気生理学的性質、種々の薬物に対する感受性を詳細に比較検討した。(結果) (1) 3 つの Ca^{2+} 電流の電流電圧関係、活性化・不活性化の電位依存性およびキネティクス、イオン透過性には明らかな違いが見られた。(2) R-型、T-型 Ca^{2+} チャネルを特異的に抑制する SNX-482, sFTX3.3 は、それぞれ $\alpha 1E$, $\alpha 1G$ による Ca^{2+} 電流を特異的に抑制した。(3) DHP 系 Ca^{2+} 拮抗薬 nimodipine (10 μM) は $\alpha 1E$ に対して全く効果がなく、NICC を中等度、 $\alpha 1G$ を高度に抑制した。(3) 従来 T-型に選択的と考えられてきた Ca^{2+} 拮抗薬 mibefradil は 3 つの電流に対してほぼ同等の抑制効果を示した (-60 mV における NICC, $\alpha 1E$, $\alpha 1G$ に対する IC_{50} 値: 0.3, 0.35, 0.14 μM)。 (4) T-型に対する抑制が報告されている新規 Ca^{2+} 拮抗薬 SUN N5030 や phenytoin, etosuximide による阻害効果に関しても、NICC, $\alpha 1E$, $\alpha 1G$ 間に僅かな差しか見られなかった。(結論) 以上の結果から、NICCs の分子構造を特徴付ける幾つかの重要な性質は $\alpha 1E$, $\alpha 1G$ のそれと決定的に異なるものの、その薬理学的特性には 3 種の電流間で (特に NICC と $\alpha 1G$) 殆ど差がないことが明らかになった。

32. 高血圧発症ラット (SHR) 大動脈平滑筋の酸性下での異常収縮機構の電気生理学的検討

名古屋市立大学・薬・細胞分子薬効解析学¹, 東北大学・薬・分子生物薬学²

喜吉 英和¹, 橘川 美香¹, 齊藤 真也², 大矢 進¹, 村木 克彦¹, 大泉 康²
今泉 祐治¹

外液 pH を酸性にすることにより引き起こされる大動脈平滑筋の収縮反応が、正常血圧の Wistar Kyoto ラット (WKY) に比べ高血圧発症ラット (SHR) では顕著に増大していることが知られている (Furukawa et al., 1996)。今回、この異常収縮機構について、電気生理学的手法を用いて検討を行った。大動脈標本にガラス微小電極法を適用し平滑筋の膜電位測定を行ったところ、酸性 pH 変化に伴う脱分極が確認された。この酸性 pH 誘起性の脱分極は、WKY に比べ SHR において有意に大きかった。大動脈平滑筋を単離し、パッチクランプ法により外向き K^{+} 電流測定を行ったところ、酸性 pH 変化に伴う K^{+} 電流の減少が認められた。この電流の変化は、WKY に比べ SHR で大きい傾向が見られた。1 μM Penitrem A を用いて大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^{+} (BK) チャネルを阻害したところ、BK チャネル電流成分は WKY に比べ SHR の方が大きいことが明らかとなった。1 μM Penitrem A 存在下において、酸性 pH 変化による K^{+} 電流の減少は僅かであった。大動脈平滑筋において RT-PCR 及び Western blot による解析を行ったところ、pH 感受性 K^{+} チャネルとして BK チャネル以外に TASK1, TASK2 の発現が確認された。WKY と SHR で比較したところ、それらの蛋白発現量に有意な差は認められなかった。一方、BK チャネルの蛋白発現量は SHR で有意に増大していた。以上の結果から、酸性 pH 誘起性の収縮は、BK チャネルの抑制とそれに伴う脱分極を介しており、SHR での BK チャネルの発現増大が酸性 pH による異常収縮に大きく寄与している可能性が示唆された。TASK の寄与はあったとしても僅かであると推測された。

33. モルモット膀胱平滑筋の自発性収縮の性質と BK チャネルの役割の検討

東邦大学・薬・薬理学¹, 同・薬・薬物学²

田中 芳夫^{1,2}, 今井 利安², 岡本 貴男^{1,2}, 堀之内孝広¹, 田中 光², 小池 勝夫¹
重信 弘毅²

【目的】膀胱の生理的役割は尿の貯留と排泄であり、その機能は膀胱平滑筋の収縮性変動を反映する。膀胱平滑筋の収縮は様々な化学因子や物理的要因による複雑な制御を受けるが、基本的には平滑筋で発生する自発性の筋原収縮がその構成要素である。自発性収縮の発生機序の詳細はいまだに不明であるが、平滑筋細胞で発生する活動電位との関係が示唆されている。本研究では、モルモット膀胱平滑筋で発生する自発性収縮の基本的特徴を活動電位との関連性も含めて解析するとともに、平滑筋細胞に高密度に発現している BK チャネルの役割を検討した。【方法】モルモットから膀胱を摘出後、三角部を取り除いて標本（長さ 8~10 mm×幅 1~2 mm）を作製し、張力変化を等尺性に記録した。膜電位変動は微小電極法により記録した。また、ペンタバルビタールで麻酔したモルモットの膀胱内にバルーンを挿入して内圧変動を記録した。【結果】① 摘出標本に 0.5 g の負荷を与えて 15-40 分経過後に筋原性の自発性収縮の発生を認めた。また、記録された活動電位も筋原性であった。② Nisoldipine (100 nM)・diltiazem (10 μM) は、活動電位を完全に消失させたが、自発性収縮に対しては有意な抑制を示したものの消失させることはなかった。Nisoldipine 非感受性の収縮成分は、gadolinium (200 μM) により強く抑制された。③ 今回検討した K チャネル阻害薬のなかでは BK チャネルに選択性を有する Iberitoxin (IbTx) に最も強い収縮増強効果を認めた。IbTx は活動電位の頻度を顕著に増加させ、活動電位持続時間も有意に延長させた。④ 骨盤神経切断の有無によらず律動的な膀胱内圧変動が観察され、IbTx はこの膀胱運動の発生頻度を増大した。【考察】活動電位の制御によりモルモット膀胱平滑筋の自発性収縮の発生に際して負帰還機構として機能する BK チャネルの役割の重要性が示された。生体内における尿の排泄制御に対しても BK チャネルの果たす役割の比重は高いものと推測される。

34. 蛋白分解酵素によるブタ尿道平滑筋 ATP 感受性カリウムチャネルの化学的修飾

九州大学・医・生体情報薬理学

寺本 憲功, 伊東 祐之

細胞膜内側から chymotrypsin, carboxypeptidase A, papain 等の蛋白分解酵素を投与するとイオンチャネルの立体構造が変化しチャネルの電気生理学的特性が、劇的に変化することが様々な種類のイオンチャネルで知られている。蛋白分解酵素は、主に各種細胞内小器官に広汎に分布し高濃度で貯蔵されておりイオンチャネルと蛋白分解酵素による修飾とは密接な関係があると考えられている。例えば膵臓 β 細胞、心筋の ATP 感受性 K⁺ チャネル (K_{ATP} チャネル) はチャネル活性がランダウンした後、蛋白分解酵素処理によりチャネルの再活性化が報告されているが平滑筋の K_{ATP} チャネルに関する蛋白分解酵素による修飾に関する報告は全くない。

今回、我々は、パッチクランプ法を用いてブタ尿道平滑筋における K_{ATP} チャネルに及ぼす蛋白分解酵素の効果を検討した。インサイドアウト状態（細胞内外液共に 140 mM）で K_{ATP} チャネルのチャネル活性が完全にランダウンした後に trypsin (1 mg/ml) や carboxypeptidase B (0.1 mg/ml) を細胞膜内側から投与すると約 10 分後にセルアツクツチ状態で levcromakalim (10 μM) 存在下で観察された K_{ATP} チャネルと同じコンダクタンス、同じ開口、閉口時間、同様の内向き整流性を有する K⁺ チャネルの活性が観察された。この K⁺ チャネルの cibenzoline 感受性及び ATP 感受性は K_{ATP} チャネルと有為な差は観察されなかったが (cibenzoline, IC₅₀ 値, 5 μM; ATP, IC₅₀ 値, 300 μM), 一方 glibenclamide 感受性は、K_{ATP} チャネルに比し約 10 倍減弱していた (IC₅₀ 値, 5 μM)。また細胞外側から蛋白分解酵素を投与しても膜電流は惹起されず levcromakalim (100 μM) 投与により惹起した K_{ATP} 電流にも影響を及ぼさなかった。

以上より蛋白分解酵素を細胞膜内側に投与するとブタ尿道平滑筋 K_{ATP} チャネルは再活性化されチャネルのポア領域には影響を及ぼさないが glibenclamide 結合部位を修飾していることが示唆された。

35. ヒト膀胱平滑筋からの acetylcholine (ACh) 放出量に及ぼす加齢の影響

熊本大学・医・泌尿器科

吉田 正貴, 村上 滋孝, 稲留 彰人, 宮前 公一, 榎永 浩一, 上田 昭一

〔緒言〕膀胱機能は加齢により変化することが知られている。また、膀胱収縮の主要な神経伝達物質は ACh であるが、膀胱平滑筋からの ACh の放出に対する加齢や膀胱張力の影響についての検討はほとんど行われていない。今回我々は、摘出ヒト膀胱条片を用いて ACh 放出とこれらの因子との関係を検討した。〔方法〕ヒト膀胱条片は膀胱腫瘍により摘出した正常膀胱体部より作成し、これに microdialysis 用プローブを挿入して筋浴槽内に懸垂固定し、等尺性トランスデューサー介して張力変化を記録した。ACh の基礎放出および経壁電気刺激 (EFS: supramaximum voltage, duration 0.3 msec, 40 Hz, train 3 sec) 時の ACh 放出量に対する年齢と膀胱条片の basal tension (0~4 g) の影響を観察した。ACh 量は microdialysis 法で回収された透析液を電気化学検出器付き HPLC に注入して測定した。〔結果〕EFS によりヒト膀胱平滑筋からは周波数依存性に ACh が放出され、収縮反応が惹起された。この EFS による ACh 放出量は加齢とともに減少し、年齢との間に有意の負の相関関係が認められた。また、張力をかけない状態でもテトロドトキシンで抑制されない、神経原性以外の ACh 放出 (基礎放出) が認められた。この基礎放出量は加齢により有意に増加した。また膀胱上皮を有する切片では、条片の basal tension をを増加させることにより基礎放出量は増加し、その増加率は高齢者で有意に高かった。上皮を有さない条片では basal tension の増加によっても基礎放出量の変化は認められなかった。〔結論〕膀胱からの EFS による ACh 放出は加齢により減少するが、ACh の基礎放出は膀胱の伸展および加齢により増加する。また、この増加には膀胱上皮が関係していることが示唆された。これらの ACh 放出量の変化が加齢に伴う膀胱機能障害に関係している可能性が推察された。

36. In vivo microdialysis 法を用いた 2 型糖尿病モデルラットにおける膀胱平滑筋からのアセチルコリン放出量の測定について

熊本大学・医・泌尿器科

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

【目的】2 型糖尿病の膀胱平滑筋における自律神経障害について検討する目的で非肥満 2 型糖尿病モデルである GK ラットを用いて骨盤神経の電気刺激によるアセチルコリン放出量を in vivo microdialysis 法にて測定した。

【方法】8 週, 32 週の雌性の wistar ラットと非肥満 2 型糖尿病モデルの GK ラットを 900 mg/kg のウレタン麻酔下に開腹し、経尿道的に 20 G のカテーテルを膀胱内に挿入した。膀胱壁に臓器用透析プローブを貫通させ、エゼリン入りリンゲル液を透析液として 2 μ l/min で灌流させながら圧力トランスデューサーを介して膀胱内圧を測定した。透析液は 10 分毎に回収しながら片側の骨盤神経末梢側をフック型電極にのせ電気刺激 (supramaximum voltage, pulse duration 0.1 ms, frequency 1-10 Hz, train of pulse 60 s) を行った。回収液は電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーに注入し分析してアセチルコリン量を測定した。

【結果】8 週齢においては骨盤神経刺激による膀胱収縮力、アセチルコリン放出量共に wistar ラット、GK ラットで有意な差は認めなかった。32 週齢 GK ラットの膀胱収縮力、アセチルコリン放出量は wistar ラットに比べて有意に低下していた。

【結論】非肥満 2 型糖尿病モデルの膀胱平滑筋において加齢が進むにつれ、アセチルコリン放出量が減少し、膀胱収縮力も低下することによりこれが 2 型糖尿病の膀胱機能障害と関係している可能性が示唆された。

37. 摘出ヒト膀胱平滑筋に対する YM905 の作用の検討

熊本大学・医・泌尿器科

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

【目的】 頻尿・尿失禁治療薬として開発された YM905 は、ムスカリン M3 受容体に比較的高親和性を示し、動物実験では他の臓器に比較して膀胱に対する選択性が認められているが、ヒト膀胱に対する本薬剤の作用を検討した報告は見られない。今回我々は摘出ヒト膀胱平滑筋に対する YM905 の薬理学的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から摘出した膀胱の正常体部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 及び経壁電気刺激収縮 (EFS: supramaximum voltage, 0.3 msec duration, 2-60 Hz, 3.0 sec train) に対する YM905 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 (0.1 μ M-10 mM) は膀胱平滑筋を用量依存性に収縮させた。YM905 (10 nM-10 μ M) の前処置は CCh の用量反応曲線を右方に移動させたが、高濃度の前処置でも最大収縮はほとんど抑制しなかった (pA_2 値: 7.83 ± 0.07 ; Slope 1.19 ± 0.03)。また 80 mM KCl による収縮に対して YM905 はほとんど影響を示さなかった。EFS による周波数反応曲線に対して YM905 は用量依存性に収縮反応を抑制した。また, atropine 1.0 μ M の存在下で残存する EFS による atropine 抵抗性収縮に対して YM905 は有意な抑制作用を示さなかった。

【結論】 YM905 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。

38. 妊娠ラット子宮平滑筋細胞における ATP 受容体の電気生理学的性質と収縮制御機構としての役割

広島大学・医・産婦人科

三好 博史, 大濱 紘三

子宮収縮の周期性つまり陣痛間隔を制御する機構は十分に解明されていない。昨年我々は、妊娠ラット子宮平滑筋細胞の非選択性陽イオンチャンネル (以下 NSCC) が自然脱分極を介し周期性を制御している可能性を報告した。一方、子宮平滑筋において分子生物学的に ATP (P2) 受容体の存在が報告されたが収縮促進機序は明らかではない。今回、ATP 受容体を透過するイオン電流を記録したので、その性質と収縮制御における役割を検討する。妊娠 18-20 日のラット子宮縦走筋よりコラゲナーゼで単離した平滑筋細胞に whole cell patch clamp 法を使用した。阻害剤で Ca, K, NSCC 電流を抑制し ATP 受容体電流を分離記録した。細胞外 ATP (0.01-1 mM, $K_d=0.07$ mM) により活性化さ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。ATP 以外のプリン体および誘導体においても促進効果を認め、その強さは $\alpha\beta$ -Methylene ATP > ATP > 2-Methylthio ATP > UTP > GTP > ADP の順であった。各一価陽イオンの逆転電位は K; 11.0 ± 2.8 mV (n=11), Cs; 7.3 ± 1.7 mV (n=14), Li; 7.2 ± 4.4 mV (n=10), Na; 1.8 ± 2.6 mV (n=15) と計測され、透過性は K > Cs > Li > Na の順であった。P2 阻害剤であるスラミン (0.1 mM) および P2X 選択的阻害剤 PPADS (0.03 mM) に高い感受性を示すことよりこのチャンネルは ATP 受容体の中でも P2X receptor であると判断した。ATP 受容体電流は NSCC と同様に静止膜電位 -50 mV において持続性内向き電流であり、膜を脱分極させ子宮収縮を誘発すると推測された。また、細胞外 Mg により ATP 受容体は濃度依存性 ($K_d=0.32$ mM) に阻害され、臨床的に早産治療に使用される Mg の子宮収縮抑制機構の一つと考えられた。

39. 新規海洋天然毒ペクテノトキシン2の平滑筋に対するアクチン脱重合作用

東京大学・農・獣医薬理学

堀 正敏, 尾崎 博, 唐木 英明

【目的】ペクテノトキシン-2 (PCTX-2) は、養殖ホタテ貝の毒化の原因物質として単離精製・構造決定された、多数のエーテル環とラクトン環を持つマクロライド化合物である。PCTX-2の生理活性作用については、種々の癌化細胞株に細胞毒性を示すことが報告されているが、その詳細は不明である。そこで、本研究は、平滑筋を用いてPCTX-2の生物活性作用を明らかにすることを目的とした。

【結果】PCTX-2は、ラット大動脈における72.7 mM KClおよび $1\mu\text{M}$ フェニレフリン収縮を濃度依存性に抑制した。さらに、血管平滑筋由来のA7r5細胞において、PCTX-2は細胞形態には大きな変化を与えなかったが、FITC・ファロイジン染色によりアクチン線維を減少させることが示唆された。次に、PCTX-2が直接アクチン重合を阻害する可能性を検証するために、単離骨格筋G-アクチンを用いてアクチン重合への影響を検討した。PCTX-2は、ピレン蛍光ラベルしたG-アクチンの重合に伴う蛍光強度増強速度とその最大蛍光を濃度依存性に抑制したことから、アクチンに直接作用してその重合を抑制することが明らかになった。また、PCTX-2はF-アクチンを切断する作用は持たず、G-アクチンを隔離することによって脱重合を引き起こすことが示唆された。最後に、PCTX-2のA7r5細胞への影響を電子顕微鏡にて詳細に検討したところ、PCTX-2は接着斑を形成する基底膜側の細胞膜直下のアクチン繊維には全く影響を与えずに、細胞表面の細胞膜直下の裏打ちアクチン構造を選択的に脱重合することが明らかにされた。また、PCTX-2は微小管構造や中間径フィラメントの構造には影響を与えなかった。【考察】PCTX-2はG-アクチンを隔離することにより、F-アクチンを脱重合させる新規のアクチン脱重合剤であることが示唆された。また、平滑筋細胞においては接着斑を形成しない細胞表面の細胞膜裏打ちアクチン構造を特異的に脱重合することが示唆された。

40. 平滑筋細胞の薬理学的性質及びタンパク質の培養による変化

昭和大学・薬・薬理

百瀬 和享, 飯島 道子, 桐木 里佳, 高田 憲子, 野部 裕美

【目的】単離直後の平滑筋細胞は収縮能を保持しているが、ウシ胎児血清 (FCS) 存在下で培養すると収縮能が消失する。すなわち、分化型から脱分化型への形質転換を示す。両者を比較・検討することは平滑筋収縮機構の解明に意義あるものと考えられる。本研究は、FCS存在下及び非存在下で培養した平滑筋細胞について、それぞれの薬理学的性質及び収縮タンパク質の変化を観察することにより、収縮に関する知見を得ることを目的とする。【方法】単離細胞はモルモット回腸縦走筋から酵素法により調製し、FCS存在下で培養を開始した。サブコンフルエントあるいはコンフルエントの時点でFCSを除去して、さらに培養を続けた。収縮能は弱いトリブシン処理後、CChあるいはATPを適用し、位相差顕微鏡で観察し、画像をデジタルカメラにて取得した。Ca²⁺応答は蛍光顕微鏡画像解析システムにて検出した。タンパク質の分離及び同定はSDS-PAGE及びWestern Blottingにより行った。【結果】単離平滑筋細胞は紡錘形を示すが、FCS存在下で培養すると玉石状を経て再び紡錘形となった。FCSを除去するとさらに長い紡錘形を示した。CCh適応によるCa²⁺応答は上昇傾向を示すようになり、同時にM₃受容体タンパク質も増加傾向を示した。収縮タンパク質については、平滑筋型アイソフォームの増加と同時に非筋型アイソフォームの残存が観察された。収縮能は、サブコンフルエントの時点では観察されたが、コンフルエントの時点では観察されなかった。各々の時点でFCS非存在下でも同様であった。【結論】FCS除去により、培養平滑筋細胞の脱分化型から分化型への部分的な形質転換が起きていること及びCChによるCa²⁺応答の上昇には受容体タンパク質の増加が関与していることが示唆された。また、培養による収縮能の消失は収縮タンパク質の非筋型アイソフォームへの変化によることが示唆され、これについては細胞骨格系の再構築が関与する可能性が考えられる。

41. イヌ脳底動脈の伸展誘発性プロテインキナーゼ C δ の活性化におけるインテグリンを介する Rho/Rho キナーゼ系の関与について

静岡県立大学・薬・薬理学

見立 絢子, 小原 一男, 野沢 佳代, 中山 貢一

【目的】 イヌ脳底動脈において緩徐伸展刺激によりプロテインキナーゼ C (PKC) δ のトランスロケーションが惹起されることを報告してきた。今回は伸展誘発性 PKC δ の活性化における Rho/Rho キナーゼ系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 の速度で初期筋長の 1.5 倍に緩徐伸展を 15 分間加えた。PKC および Rho の活性化の指標として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 SDS-PAGE, イムノブロット法を用いて測定した。

【結果】 イヌ脳底動脈には PKC α , δ , ζ および η の 4 種類のアイソフォームが存在し, このうち緩徐伸展により PKC δ のみのトランスロケーションが惹起された。また, 緩徐伸展により Rho もトランスロケーションすることが確認された。PKC δ および Rho のトランスロケーションはインテグリンの活性を阻害する RGD ペプチドおよび Rho の活性を阻害するボツリヌス C3 酵素により抑制された。PKC δ のトランスロケーションは Rho キナーゼ阻害薬の Y-27632 で抑制された。また, PKC の阻害薬カルホスチン C により, PKC δ のトランスロケーションは抑制されたが, Rho のトランスロケーションは影響をうけなかった。

【考察】 イヌ脳底動脈において伸展刺激による PKC δ の活性化はインテグリンを介する Rho/Rho キナーゼ系の活性化により調節されることが示唆された。

42. 神経幹細胞から血管内皮細胞への分化誘導

明治薬科大学・薬理学

川北 映輔, 大石 一彦, 内田 幸宏

神経幹細胞は, 増殖し継代を繰り返すことができると同時に, 中枢神経系の細胞に分化誘導することができる未分化な神経系の細胞と考えられている。我々は, 脳内に存在する神経幹細胞から平滑筋細胞に分化誘導する系を確立し, この細胞を三次元培養して人工の平滑筋組織に構築すると, 血管作動性アゴニストにより平滑筋様の収縮を発生することを見出した (Oishi K. et al., *J. Physiol.*, 540, 139-152, 2002)。一般に, 血管平滑筋細胞の多くは, 側板中胚葉由来の未分化間葉細胞に, また, 大動脈起始部の血管平滑筋細胞は神経冠細胞 (neural crest cells) に由来すると考えられている。したがって, 生体内には神経幹細胞由来の平滑筋細胞が新たに存在する可能性が考えられる。神経幹細胞の血管形成への関与を調べる目的で, 今回我々はこの神経幹細胞が内皮細胞に分化誘導する可能性について検討した。【方法】 マウス胎仔 (E12) 由来培養神経幹細胞を 10% 牛胎仔血清 (FBS) 存在下, 低密度 (2.5×10^3 cells/cm²) で 1 から 7 日間培養することで分化を誘導した。また, このときの発現蛋白質を免疫染色法と RT-PCR 法により解析した。【結果】 培養 1 日目では, ほとんどの細胞は数石状の形態に変化し内皮マーカー蛋白質の VE-cadherin や PECAM-1 の発現が観察された。培養 1 日目では, 平滑筋型アクチンである α -actin の発現はほとんど観察されなかったが, 培養日数を増大するに従って α -actin 陽性の細胞が増大し, 培養 7 日目ではほとんどの細胞が α -actin 陽性であった。【考察】 神経幹細胞を FBS 存在下で培養すると平滑筋細胞への分化に先んじて内皮細胞への分化が誘導されることが明らかとなった。したがって, 神経幹細胞より分化誘導した血管系細胞が脳血管の形成や再構築に関与する可能性が考えられる。

43. SHR および WKY 摘出大動脈標本における細胞外低 pH 誘発性細胞内 pH 低下および収縮応答の比較

東北大学・薬・分子生物薬学

ディリープ・クマール・ローラ, 齊藤 真也, 大泉 康

平滑筋を含め,細胞において pH は様々な機能を制御している.以前に我々は自然発症性高血圧ラット (SHR) および Wistar Kyoto ラット (WKY) から摘出した大動脈標本においては,細胞外 pH (pH_o) の酸性化によって収縮が引き起こされ, しかもその大きさは前者においてより強いことを報告した (Furukawa et al., 1996). 本研究では SHR および WKY より摘出した大動脈標本に対する pH_o の低下による細胞内 pH (pH_i) 変化および酸性 pH 誘発性収縮との相関性を検討した.

【結果】 pH_o 7.4 における pH_i は SHR および WKY は同程度であった. どちらの標本においても pH_o を 6.5 に下げると急激に pH_i が低下し, 収縮が発生した. pH_o を 6.5 にした場合の pH_i 低下のピークは SHR の方が WKY より有意に高かった. 静止時の大動脈に対しての, Na^+/H^+ 交換体抑制薬である amiloride の投与は SHR において pH_i の低下と収縮を引き起こしたが, WKY においてはごく弱い反応しか見られなかった. しかし pH_o が 6.5 の場合では WKY において amiloride はさらに pH_i を低下させ収縮を引き起こしたが, SHR においてはわずかな作用しか示さなかった.

【結論】 酸性 pH 誘発性収縮の大きさは細胞内の酸性化の程度に比例する. また, SHR 大動脈における pH_i の低下は WKY におけるそれよりも大きく, それは Na^+/H^+ 交換体の機能不全というよりも細胞内への酸取り込み機構の活性化によるものと考えられる.

44. Rho-Kinase を介する血管平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性亢進におけるスフィンゴ脂質および Src Family Protein Tyrosine Kinase の役割

山口大学・医・分子細胞生理学

佐藤 正史, 中尾 文昭, 津田 泰任, 津本 麗奈, 最上紀美子, 小林 誠

血管平滑筋細胞の Ca^{2+} 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. この Ca^{2+} 非依存性収縮を引き起こす細胞内シグナル機構としては, RhoA-ROK による経路, PKC とその下流の CPI-17 による経路, アラキドン酸による経路等が知られている. 最近, 我々は, 新たにスフィンゴ脂質-ROK の経路を同定した. 本研究では, ブタ冠動脈平滑筋を用いて, スフィンゴ脂質-ROK の経路における Src Family Protein Tyrosine Kinase (SrcPTK) の関与について検討した.

ブタ冠動脈平滑筋において, SrcPTK 阻害薬 (PP1) および ROK 阻害薬 (Y27632) は, sphingosylphosphorylcholine (SPC) による Ca^{2+} 非依存性収縮を阻害したが, 高カリウム刺激による収縮は阻害しなかった. また SrcPTK inhibitor の negative compound である PP3 は, この SPC による異常収縮を阻害しなかった. ラット大動脈平滑筋の初代培養細胞を用いて SPC で刺激したところ, SrcPTK および ROK は細胞質から細胞膜へ translocation をおこした. ROK の translocation は PP1 により阻害されたが PP3 では阻害されなかった. 抗リン酸化抗体を用いた western blotting によって酵素活性を検討してみると, SPC は SrcPTK と ROK を活性化させた. SrcPTK の活性化は PP1 で阻害されたが, PP3 や Y27632 は無効であった. ROK の活性化は PP1 と Y27632 で阻害されたが, PP3 は無効であった. これらの結果により SPC は SrcPTK の活性化を介して ROK を活性化し, 血管平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性を亢進させるものと考えられた.