

SL-1

消化管平滑筋機能障害の研究をめぐって

— 平滑筋学会とともに学んだ 30 年 —

東北大学総合診療部（日本平滑筋学会理事長）

本 郷 道 夫

消化管は上部食道を除き全てが平滑筋によって内容物の移送，混和，貯蔵，逆行防止，などの機能を行っている。消化管平滑筋の機能は，基本的には収縮と弛緩の運動によって，前述のような多彩の機能を遂行している。そのため消化管平滑筋の機能障害も多彩であり，またその評価法も多彩となる。さらに消化管平滑筋機能は ICC（カハールの間質細胞）を含む内在神経や外来神経による機能制御，内腔刺激等に由来する液性因子の影響，そして更には中枢神経系の制御と，多種の制御系によって機能が営まれる。筆者は研究生活 2 年目の昭和 52(1977) 年 8 月，仙台で開催された第 19 回日本平滑筋学会においてイヌ十二指腸酸性化時の LES 圧と消化管ホルモンの検討でシンポジストとして初めての全国学会発表を行った。それ以来，海外留学期間中を除いて毎回，本学会に参加してきた。アカラシアの Ca 拮抗薬による治療，RI による胃排出機能評価，胃電図の臨床応用，放射線非透過マーカーによる消化管通過時間の評価，など，消化管平滑筋機能の評価法あるいは運動障害の病態生理の研究を本学会で発表してきた。本学会の独特の学際的集団のなかで，多くの先輩や仲間の励ましを受けて研究者として育てていただいた。RI による胃排出機能検査標準法の確立はその中でも印象に残ることである。さらにこのような研究をもとに国際グループの一員として消化管運動障害の新分類の作業に加わったことも，平滑筋学会で育てていただいた恩恵のひとつである。これからの平滑筋研究の推進にあたり，筆者のこれまでの歩みを振り返り，新たな出発点としたい。

消化管の知覚-運動制御

東北大学大学院医学系研究科行動医学

福 土 審

臨床的に消化管の知覚-運動制御機構を考える時、消化管自動能の制御機構が重要である。しかし、この過程において、脳腸相関を除外することは既に極めて困難である。脳腸相関とは、脳と消化器の機能的関連を指す。臨床的にはストレスによって発生もしくは増悪する消化器症状、ならびに、消化器症状によって情動が影響される現象をいう。基礎的には脳機能と消化器の機能のあらゆる関係が脳腸相関に包含される。脳腸相関は消化器病以外の専門家には耳馴れぬ用語かもしれない。しかし、最近、基礎的にも臨床的にも脳腸相関の持つ重要性が認識されはじめている。「脳が末梢臓器を支配する」というのが19世紀以来の科学観であると言っても過言ではなかろう。運動野から出た一次運動ニューロンは脊髄前角でシナプスを形成し、二次運動ニューロンに信号を伝達し、骨格筋を収縮させる。この現象からの類推で脳由来の自律神経による末梢臓器の機能制御が解明されて来た。研究の進展により、消化管は、この類推があてはまらない代表的臓器であることが判明して来た。20世紀後半には、消化管ホルモン、消化管の持つ自動能、独自の神経ネットワーク (enteric nervous system: ENS) の機能が明らかにされた。その過程において、脳由来の自律神経による消化器の機能制御は、きわめて限定的な意味しか持たぬものという印象が賦与された。消化性潰瘍は、脳由来の迷走神経興奮がその病態形成上重要とされ、1970年代まで盛んに迷走神経切断術がなされた。その後、ヒスタミンH₂受容体拮抗薬とそれに続くプロトンポンプ阻害薬の開発、更には *Helicobacter pylori* 除菌療法の好成績により、脳由来の迷走神経興奮の意義はあまり重視されなくなった。しかし、これらの知識を動員しても、なお克服できないありふれた消化器病の一群が存在する。過敏性腸症候群 (irritable bowel syndrome: IBS) とその類縁疾患群 (functional gastrointestinal disorders: FGIDs) である。消化管の持つ自動能に焦点をあてても解決できない。1970年代に見い出されていた内臓知覚過敏の病態生理を復活再検討して、やっと解明への道程が見えて来た。内臓知覚過敏は、「消化管由来の信号が脳機能を左右する」という概念を生む。これは、「脳が末梢臓器を支配する」という概念とは全く逆である。かくして、消化器から脳への信号の臨床的重要性が認識されるに至った。さらに進んで、脳から消化器への信号の多様性と臨床的意義が再認識されつつある。21世紀前半には、脳腸相関を軸とした消化管の知覚-運動制御機構の解明がさらに進むであろう。

SL-3

MaxiK channels, Caveolin and Vascular Function

Department of Anesthesiology, Division of Molecular Medicine, University of California,
Los Angeles, Los Angeles, CA, 90095, USA.

Abderrahmane Alioua, Rong Lu, Yogesh Kumar, Mansoureh Eghbali,
Enrico Stefani and Ligia Toro

The large conductance, voltage- and Ca^{2+} -activated potassium (MaxiK, BK) channel and caveolin-1 play an important role in vascular function. MaxiK channels are composed of the pore-forming α - and modulatory β -subunits. Caveolin-1 is a structural protein of caveolae, which are invaginations of the plasma membrane. Disruption of caveolae with β -methylcyclodextrine impairs agonist-induced vascular contraction and MaxiK β 1 subunit gene ablation produces moderate hypertension. At the cellular level, MaxiK channels and caveolin-1 coexist. Immunolocalization demonstrates a striking proximity of both proteins and sucrose gradient centrifugation demonstrate that both caveolin and MaxiK α subunit commigrate to low-density fractions. Reverse co-immunoprecipitation experiments indicate that both vascular caveolin-1 and MaxiK associate in a macromolecular complex. In vitro experiments indicate that in vascular smooth muscle MaxiK α subunit interacts directly with caveolin-1 via its carboxyl terminus. Interestingly, electrophysiological and immunocytochemistry experiments demonstrate that MaxiK α subunit surface targeting was dramatically prevented by caveolin-1 over-expression due to channel trapping in cytoplasmic compartments. Thus, caveolin-1 and MaxiK interaction favor their co-localization in caveolae, and possibly control MaxiK channel surface targeting in vascular smooth muscle. Supported by NIH (LT, ES) and AHA (ME and AA).

アシドーシスによる血管平滑筋収縮のメカニズム

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学

大 泉 康, 斉 藤 真 也, 山 国 徹

生物は個々の細胞が正常に機能を発揮することで生きていくことが出来るが、そのために pH を含め、生体における恒常性の維持というものが重要になってくる。体液の pH は通常 pH 7.2-7.4 の範囲に収まるように厳密な調節を受けており、細胞内の pH もそれよりは若干低いものの、pH 7.0-7.2 に維持されている。しかしながら、何らかの原因により血液循環に障害が起こると、末梢においては容易に pH の低下が起こることが知られており、至適条件を離れた pH によって蛋白質の機能は何らかの影響を受け、病態生理的状态へ移行する。

アシドーシスが起こると、血管が弛緩あるいは収縮するという相反する報告があり、その反応について統一的に説明することはまだ不可能である。例えば、大動脈、冠動脈および脳底動脈) などではアシドーシスにより弛緩するという報告が一般的であるが、肺動脈や腸間膜動脈では収縮を起こすといわれている。我々の研究室ではラット摘出大動脈でも収縮するという興味深い事実を見出したので、現在その詳細なメカニズムの解明を試みている。すなわち、ラット摘出大動脈ならびにラット冠動脈において、酸性 pH による平滑筋の収縮(酸性収縮)が起こったが、酸性収縮の大きさと血圧との間に強い正の相関が見られた。この発見はアシドーシスが重大なリスクファクターとなり、高血圧によって血管の攣縮が起こりやすくなることをはじめて示すものとして注目される。

筆者のグループはラット大動脈において、その収縮が K チャネル開口薬ならびに Ca チャネル阻害薬だけでなく、Cl チャネル阻害薬によっても抑制を受けること、また培養血管平滑筋細胞においてアシドーシスで実際の脱分極が Cl チャネル阻害薬によって阻害されることを見出し、少なくとも一部は Cl チャネルの関与による脱分極を介して電位依存性の Ca チャネルが開口し、その結果流入する Ca が収縮の直接の引き金になっていることを明らかにした。

最近、筆者らは血管平滑筋の酸性収縮の発生メカニズムについて、蛋白質のリン酸化という観点から詳細に検討を行ない、興味深い知見を得ることができた。すなわち、この酸性収縮は、チロシンリン酸化阻害剤である genistein や tyrphostin A23 および PI3 キナーゼ阻害剤の LY-294002 および wortmannin により用量依存性に抑制を受けること、また酸性収縮時にチロシンリン酸化が促進される蛋白質が存在し、しかもそのなかの数種類の蛋白質のリン酸化がチロシンリン酸化阻害剤で抑制されることなどが明らかとなった。さらに、酸性 pH により PI3 キナーゼのチロシンリン酸化が顕著に促進された。これらの結果は、これらの蛋白質が酸性収縮メカニズムに重要な役割を果たしていることを示すものである。

E-1

下部尿路機能障害に対する薬剤開発の現況

熊本大学大学院医学薬学研究部泌尿器病態学

吉田正貴

下部尿路機能障害と一言でいっても、原因としては様々な疾患が存在し、その症状は多彩であり、治療法も様々である。治療法としては、原因疾患に対する治療を優先させることは言うまでもないが、下部尿路機能障害自体が生活の質(QOL)に関係するものであるため、対症的、保存的に治療されることも多く、特に、薬物療法が第一選択となることが多い。

下部尿路機能障害は大きく蓄尿障害と排尿障害に分けられる。過活動膀胱は尿意切迫感を主症状とし、頻尿や夜間頻尿を有する症候群として最近定義され、蓄尿症状を呈する主要な疾患であり、本邦においても800万人を超す患者の存在が報告されている。この過活動膀胱の治療には、抗コリン薬が汎用されている。しかしその治療効果については必ずしも満足が得られる成績が得られているわけではなく、現在使用できる薬剤の種類も限られている。抗コリン薬については口渇、便秘、残尿の発生や認知障害などの副作用の軽減をめざして、膀胱選択性の高い薬剤や、DDSや薬物動態の工夫による新たな薬剤の開発や治験が現在行われてきている。また、膀胱平滑筋の弛緩に関与するものとして β_3 受容体やKチャンネルなども注目され、これらの薬剤への期待も高まってきている。さらに最近、蓄尿症状や排尿筋過活動の発生メカニズムとして、膀胱上皮由来の因子(ATP、プロスタグランジン、タヒキニンなど)の関与が指摘されるようになってきた。これらの因子は膀胱の伸展などの刺激により、上皮から放出され、上皮下に存在する知覚神経を刺激することにより、排尿反射や過活動膀胱症状に関与していると想定されている。そのため、これらの因子やその受容体をターゲットとした薬剤の開発も進められてきている。

一方、排尿症状に対する治療薬の開発については、前立腺肥大症治療薬として α 受容体サブタイプの選択性を応用した薬剤の開発が行われているのを除けば、あまり進展していないのが現状である。特に、排尿筋収縮障害に対する治療薬については、ここ数十年間、新しい薬の出現はなく、コリン作動薬や α_1 ブロッカーが経験的に使用されているにすぎない。また、これらの薬剤の臨床効果についてのエビデンスもほとんど皆無であり、新しい薬剤や治療法の開発が望まれている。

今回は、現在使用されている下部尿路機能障害治療薬の効果や問題点を整理するとともに、下部尿路機能障害の克服に向けての開発や治験がなされている薬剤、また、研究中であるが今後有望と考えられている薬剤や新しい治療法についてご紹介したい。

体外式超音波で診た消化管運動

川崎医科大学内科学食道・胃腸科

春 間 賢

ヒトにおける消化管運動の評価は、最も簡便な方法としてはバリウムの通過を X 線透視下に直接観察する方法があり、数値化して評価するにはアイソトープや呼吸法を用いた胃排出能や内圧測定による消化管収縮運動の測定、さらに消化管壁の拡張能や知覚の評価についてはバロスタット法が用いられている。これらの手技は確立されてきたものではあるが、使用する機器が高額であったり、被験者への侵襲も臨床の場で用いるのは問題となる。侵襲のない検査法としては、胃電図や腸電図、腸音図の測定などがあるが直接的に消化管運動を観察するものではなく、消化管運動のうちの限られたものしか評価が出来ない。

体外式超音波はもともとは肝臓や腎臓などの実質臓器、また実質臓器に接する胆嚢の観察に用いられていたが、機器の開発や診療技術の進歩にともない、胃や腸などの消化管の観察も可能となってきた。私たちの施設では、体外式超音波を消化管疾患の画像診断に用いるとともに、食道から大腸に至る消化管の運動機能評価に応用してきた。本セミナーにおいては、超音波で観察する消化管運動とはどのようなものか、また、Functional dyspepsia や過敏性腸症候群など消化管の機能性疾患を診断するために確立した手技とその成績について概説する。

S1-1. 呼吸器疾患管理における気管支拡張薬の現状

和歌山県立医科大学内科学第三内科

一ノ瀬正和

気管支拡張薬は、軽症から重症までの気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者の治療薬として広く用いられている。気管支拡張薬には β_2 アドレナリン受容体刺激薬、抗コリン薬、テオフィリンの3種類がありそれぞれ作用機序が異なっているが、それらを正しく理解することは、疾患の治療上重要である。逆の見方をすれば、それぞれの気管支拡張薬の効果の有無から、気道の病態を読み取ることもできる。即ち、 β_2 アドレナリン受容体刺激薬は気管支喘息に有効性が高く、抗コリン薬はCOPDにより効果的である。近年長時間作用型の吸入気管支拡張薬が開発、臨床応用されるようになった。これまでの気管支拡張薬の効果判定は、スパイログラムでの一秒量の変化を指標としてなされてきた。しかし、特にCOPD患者で、気管支拡張薬による運動耐容能の上昇は、一秒量の変化で予測できず、肺容量の減少程度に良く相関することが最近報告された。これは主に細気管支領域の拡張による肺の過膨張改善によると考えられる。本発表では、こういった呼吸器疾患管理における気管支拡張薬の現状について概説する。

S1-2. β_2 刺激薬と抗コリン薬の現状と展望

久留米大学医学部内科学第一

相沢 久道

気管支拡張薬は閉塞性障害を有する気道疾患の治療に用いられるが、その主なターゲットは気管支喘息とCOPD（慢性閉塞性肺疾患）である。それぞれの疾患の特徴を理解した上で使い分けが必要である。現在臨床的に用いられている気管支拡張薬は、 β_2 刺激薬、抗コリン薬、テオフィリンの3種類がある。

気管支喘息の治療では、気道の炎症を治療し気道過敏性を低下させてやるのが最も重要なことと位置づけられ、長期管理薬としての吸入ステロイド（ICS）が第一選択薬である。しかしながら、狭窄した気道を拡張してやることはもちろん必要であり、特に発作時は速やかに気管支を拡張してやるのが最も重要な治療となる。発作治療薬としては、短時間作用型の吸入 β_2 刺激薬（SABA）が最も有効である。また、長時間作用 β_2 刺激薬（LABA）が喘息治療に用いられるようになったが、これは発作時に使用するのではなく、ICSと併用する長期管理薬として用いられている。我が国ではまだ発売されていないが、近年、欧米ではLABA/ICS合剤が喘息治療の主流になってきている。

COPDでは、ICSよりも気管支拡張薬が第一選択薬と考えられている。気管支拡張薬により、臨床的にも自覚症状の軽減、QOLの改善などに加え、増悪を減少させることが報告されている。一般的には、COPDに対しては抗コリン薬が有効と考えられているが、その他、 β_2 刺激薬、テオフィリンを重症度に応じて単独または組み合わせて使用することが勧められている。その中でも、長時間作用型抗コリン薬やLABAが今後主流となっていくと考えられる。

ここでは、それぞれの疾患の病態異常に基づいた、 β_2 刺激薬と抗コリン薬の臨床的用法の現状と将来について述べる。

S1-3. テオフィリンと気管支拡張作用

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

大池 正宏, 伊東 祐之

テオフィリンは気管支喘息の発作予防と急性症状の改善に, 半世紀以上にわたり使用されている. その気管支拡張作用は気道平滑筋におけるホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害による細胞内 cAMP の増加やアデノシン受容体の阻害などによると考えられているが, 作用機序は必ずしも明確ではない. 例えば治療濃度のテオフィリンでは PDE の阻害作用はわずかであると報告されており, 一方外因性 cAMP による平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度低下や収縮蛋白リン酸化には高濃度が必要である. 従って, テオフィリンの平滑筋弛緩作用として低濃度の cAMP によるものや他の未知の機序によるものも考慮する必要がある. 我々は, 気管支喘息の主要な病態のひとつである気道過敏性に及ぼすテオフィリンの効果を検討した. はじめに, コラーゲンゲルに包埋培養したウシ気管平滑筋細胞 (BTSMC) を用いて気道過敏性の *in vitro* モデルを作成した. BTSMC を包埋培養したゲルはアゴニスト刺激によって収縮し, これは小分子 G 蛋白 RhoA の活性化作用を持つリゾフォスファチジン酸 (LPA) により有意に増大した. 一方, BTSMC の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には LPA 処理による影響はなく, ゲル収縮の増大は Ca^{2+} 感受性の増大によるものと考えられた. さらに Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 によって LPA によるゲル収縮の増大反応が抑制され, LPA は RhoA/Rho キナーゼ系の活性化によって平滑筋の過剰収縮を引き起こすと考えられた. 次に LPA による過剰収縮へのテオフィリンの効果を検討したところ, 対照ゲルには影響を与えない $1 \mu\text{M}$ の低濃度によって過剰収縮部分のみが抑制された. この効果はテオフィリンによる cAMP 産生を介した RhoA 活性化の阻害作用によっており, 以上の結果は, テオフィリンが新たな作用機序すなわち気道過敏性阻害によって気管支拡張作用を示す可能性を意味するものと考えられた.

S1-4. テオフィリンと抗炎症作用

和歌山県立医科大学内科学第三内科

平野 綱彦, 一ノ瀬正和

テオフィリン製剤は, 気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (COPD) に対して, 従来ホスホジエステラーゼ阻害作用やアデノシン受容体拮抗作用などを介した気管支拡張薬として使用されてきた. 近年, いずれの疾患の病態に対しても慢性の炎症が重要な役割を果たしていることが明らかになり, 治療戦略として気道・肺に対する抗炎症薬が注目されるようになった. しかし, テオフィリン製剤にも気管支拡張作用以外に抗炎症効果があることが明らかになりつつあり, その位置づけについて新しい可能性が期待されている. その機序についてはホスホジエステラーゼ阻害作用やアデノシン受容体拮抗作用による炎症細胞の抑制, IL-10 分泌亢進, 転写因子である NF- κ B の発現抑制等が提唱されたが, これらの作用はいずれも臨床的に高容量である $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で発揮されることより, テオフィリンの抗炎症作用の機序を説明するものでなかった. そこで注目されるのが炎症遺伝子のスイッチをオフにするヒストン脱アセチル酵素 (histone deacetylase; HDAC) の活性をテオフィリンが高め, その結果炎症性サイトカインの産生を抑制するという分子機序によるものである. 更にこの抗炎症効果は臨床的に低容量である $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で発揮されるため, 低容量のテオフィリンが抗炎症薬として, 治療薬となる可能性が考えられる. そこで今回はこのような最近のテオフィリンの抗炎症効果についての機序と臨床的有効性を概説し, 更に当施設で施行したニトロクロシンに着目したテオフィリンの抗炎症効果の知見を交えながら発表を行う.

S2-1. 肺の低酸素応答におけるカリウムチャンネルとヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ

東北大学大学院医学系研究科分子薬理学

小川 和宏, 柳澤 輝行

肺では低換気部位の動脈平滑筋が収縮して、血流を高換気部位へ振り向ける（換気—血流マッチング）。この低酸素性肺血管収縮は高い換気効率の維持に重要であるが、過剰な収縮は肺高血圧症を引き起こす。低酸素によるカリウムチャンネル遮断（急性期）やチャンネル発現量減少（亜急性期）が報告され、カリウム電流減少・脱分極が低酸素性肺血管収縮の主要機構として挙げられている。またこの血管収縮はCO（ヘム分解で生成し、ヘムに親和性が高い）で阻害されるため、ヘムが低酸素検知に関与していると考えられてきた。

最近我々は、ヘム分解酵素ヘムオキシゲナーゼ（HO）の構成型アイソザイムであるHO-2を欠損したマウスが低酸素血症を呈し、低酸素で起きる換気亢進が野生型マウスに比べて減弱していることを見出した。このHO-2欠損マウスの肺胞構造には異常が見られないため、HO-2が換気—血流マッチングを含む低酸素応答に関与していることが示唆された。他のグループからは、ヘムがカリウムチャンネルに結合して遮断すること、HO-2がカリウムチャンネルと複合体を形成し、HO-2によるヘム分解で生じるCOがチャンネルを活性化して酸素センサーとして働くことなどが報告された。一方HOの誘導型アイソザイムであるHO-1は、ヒトの細胞では低酸素により発現が減少することを我々は見出している。この結果は、低酸素はHO-2を介する応答に加え、HO-1発現低下によるCO産生減少によっても、血管収縮の方向に働く可能性があることを示唆している。この他、肺胞上皮II型由来細胞では肺動脈平滑筋とは逆に、低酸素でカリウムチャンネル群の発現が増加するという興味深い現象を我々は見出し、この発現増加の病態における意義を検討している。

肺における低酸素応答について、カリウムチャンネルとヘム分解系に焦点を当てて上述のような話題を概観し、疾患との関連を考察したい。

S2-2. 脂質メディエーターによる血管の機能調節と臨床応用

愛知学院大学薬学部薬効解析学, 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

リゾフォスファチジルコリン（LPC）やスフィンゴシン1リン酸（S1P）、リゾフォスファチジン酸（LPA）などの長鎖脂質は、その非特異的な作用により血管平滑筋や血管内皮細胞に対して様々な作用をおよぼすと報告されてきた。近年、これらの長鎖脂質が特異的に作用する endothelial differentiation gene（EDG）受容体が発見され、LPCやS1P、LPAなどが新規の脂質メディエーターとして、心循環器系組織において多様な生理作用を引き起こすことが明らかになってきた。また最近、一部のEDG受容体の強力な拮抗薬が開発され、新規の免疫抑制薬としての臨床応用が期待されている。一方S1Pはカルシウム貯蔵部位からカルシウムを遊離させ、一部の組織においてセカンドメッセンジャーとして機能する可能性や、脂質メディエーターが直接イオンチャンネルを活性化する可能性も指摘されている。本発表では、心循環器組織における脂質メディエーターの作用およびその受容体について、EDG受容体とその作用薬を中心に概説するとともに、演者らが最近行ってきた血管平滑筋および血管内皮細胞に対するS1Pをはじめとした脂質メディエーターの作用について報告する。

S2-3. 膀胱平滑筋の機能調節と臨床応用

東邦大学薬学部薬理学

田中 芳夫, 堀之内孝広, 小池 勝夫

先進国においては、高齢化に伴い蓄尿機能障害などの排尿障害が急増しているが、その発症機序は、膀胱平滑筋の収縮・弛緩機能の異常と捉えることができる。蓄尿機能障害に対して主治療薬として汎用されている抗コリン薬は、強い副作用が患者の服薬コンプライアンスを低下させるため、新しいタイプの治療薬の登場が期待されている。本研究では、膀胱平滑筋に高密度に発現しているマキシ K チャンネルと β_3 -アドレナリン受容体に着眼し、膀胱平滑筋の収縮性変動の基本的な構成要素と考えられる自発性筋原収縮の制御における役割と、それらの活性薬の新しい治療薬としての可能性を検討した。

まず、モルモット摘出膀胱標本で発生する自発性収縮と活動電位 (Ca スパイク) に対するマキシ K チャンネル阻害薬 (IbTx) の影響を検討したところ、非常に顕著な収縮増強効果と活動電位の頻度の増加効果を示した。また、チャンネルのポアサブユニット (α -サブユニット) に作用する NS-1619・niflumic acid は、単離平滑筋細胞で記録されたマキシ K チャンネルの開口確率を増大させ、活動電位の頻度を有意に減少させるとともに、自発性収縮も顕著に抑制した。マキシ K チャンネルの修飾性サブユニット (β -サブユニット) に作用する estradiol にも同様の効果が認められた。次に、自発性収縮に対するカテコラミンの抑制効果を検討したところ、その効力順位は、 β_3 受容体に対する順位と一致した。また、 β_1 ・ β_2 受容体を遮断した条件下において、自発性収縮に対するイソプレナリンの抑制作用は、 β_3 受容体拮抗作用を有するブプラノロールによって有意に抑制された。

以上の結果から、膀胱平滑筋の自発性収縮制御におけるマキシ K チャンネルならびに β_3 -アドレナリン受容体の役割の重要性と、その活性化薬の新しい蓄尿機能障害治療薬としての有用性が示唆された。

O-1. Phasic筋であるモルモット膀胱平滑筋の高濃度 K⁺ 収縮におけるモネンシンの弛緩機構

日本獣医畜産大学獣医薬理学

金田 剛治, 竹内麻由美, 清水 一政, 浦川 紀元, 中條眞二郎

モネンシン (Mon) は広く Na イオノフォアとして知られている。Mon はモルモット盲腸紐の高濃度 K⁺ 誘発性 (高 K⁺) 収縮を酸素消費量および ATP 含量の減少により抑制することが報告されている。一方、イヌ冠状動脈において Mon の前処置はウワバイン誘発性収縮を有意に減弱したことから、弛緩には Na⁺ 含量の変化が関連していることが考えられている。これらの報告は Mon の弛緩機構が phasic 筋である盲腸紐と tonic 筋である冠状動脈では異なることを示唆している。本研究において、我々は phasic 筋に分類されるモルモット膀胱の高 K⁺ 収縮における Mon の抑制機構について調べた。1) Mon (1 nM-1 μM) は高 K⁺ 収縮を濃度依存性に抑制し、0.1 μM で最大抑制を示した。2) Mon (0.1 μM), NaCN (300 μM) およびフォルスコリン (10 μM) は高 K⁺ による [Ca²⁺]_i の増加より、収縮張力をより強く抑制した。3) フォルスコリン (10 μM) は高 K⁺ 存在下で組織 cAMP 含量を増加したが、Mon (0.1 μM) は影響しなかった。4) Mon (0.1 μM) は高 K⁺ 誘発性還元型ピリジンヌクレオチド蛍光に影響せず、酸化型フラビン蛋白質蛍光を有意に抑制した。5) 高 K⁺ 存在下で Mon (0.1 μM) および NaCN (300 μM) はクレアチンリン酸および ATP 含量を有意に減少したが、フォルスコリン (10 μM) は減少しなかった。6) フォルスコリン (10 μM) は α-トキシン脱膜化標本の Ca²⁺ 収縮を有意に抑制したが、Mon (0.1 μM) は抑制しなかった。7) Mon は Na⁺ を除去した栄養液中でも、高 K⁺ 収縮を顕著に抑制した。これらの結果より、phasic 筋であるモルモット膀胱では盲腸紐と同様、Mon による弛緩機序がミトコンドリアの呼吸抑制によることを示唆する。

O-2. 神経因性膀胱患者の摘出膀胱からの acetylcholine (ACh) と adenosine triphosphate (ATP) の放出に関する検討

熊本大学大学院医学薬学研究部泌尿器病態学

梶永 浩一, 吉田 正貴, 前田 善寛, 里地 葉, 稲留 彰人, 上田 昭一

【緒言】最近膀胱上皮から放出される ACh や ATP が排尿反射や OAB の症状に関与しているとの報告が見られる。今回、神経因性膀胱患者から摘出された膀胱からの ACh と ATP 放出量を非神経因性膀胱患者から摘出された膀胱からのそれぞれの放出量について比較検討した。【対象と方法】膀胱拡大術あるいは VUR 防止術を施行した 8 例の神経因性膀胱患者 (NB 群: 二分脊椎 5 例; 脊髄損傷 3 例) および膀胱腫瘍にて膀胱全摘出術を施行した 10 例の摘出膀胱 (非 NB 群) から、膀胱条片を作成した。これに臓器透析用プローブを刺入して筋浴槽内に懸垂固定し、透析液として Ringer 液を選流した。回収した透析液中に放出された ACh および ATP 放出量はそれぞれ HPLC と luciferin-luciferase 法にて測定した。各放出量に及ぼす膀胱上皮と膀胱条片の伸展の影響を検討した。【結果】NB, 非 NB 群のいずれの膀胱条片からも非神経性の ACh と ATP の放出が確認された。この放出量は上皮を有した条片において有意に高値であり、いずれの放出量も NB 群で非 NB 群より有意に高かった。両群とも、上皮を有する条片の伸展は ACh および ATP の放出を有意に増加させた。各群で ACh と ATP の増加率を比較すると、NB 群の条片伸展による ATP 放出量の増加率は ACh に比べて顕著であった。【結論】NB 群の膀胱からの非神経性 ACh および ATP の放出には膀胱上皮が関与していることが示された。また、膀胱伸展に伴いこれらの放出量は増加し、NB 群においては ATP の放出がより重要な役割を演じている可能性が示唆された。

O-3. 膀胱下閉塞 (BOO) ラットにおける膀胱平滑筋からのアセチルコリン (ACh) および ATP 放出量の検討

熊本大学大学院医学薬学研究部泌尿器病態学

前田 善寛, 吉田 正貴, 里地 葉, 榎永 浩一, 杉山 豊, 稲留 彰人

【目的】膀胱下閉塞により膀胱の肥大化, 膀胱平滑筋収縮の変化が起こることは報告されているが, 神経伝達物質の放出量の変化についての報告はこれまでほとんどない. 今回, BOO ラットモデルを用いて摘出膀胱からの ACh 及び ATP 放出量の変化を検討した. 【方法】SD 雌性ラットに対して部分的に BOO を作製し, 2 週, 3 ヶ月, 6 ヶ月後に膀胱を摘出し, 平滑筋条片を作製して Krebs-Henseleit 液を満たした筋浴槽内に固定した. カルバコール (CCh), ATP, 80 mM KCl 及び経壁電気刺激 (EFS) に対する収縮を等尺性トランスデューサーを介して記録した. また, EFS 時にマイクロダイアリシス法を用いて透析液を回収し, ACh は HPLC にて, ATP はルシフェリニルシフェラーゼ法にて測定した. また, S100 蛋白免疫組織染色も行った. 【結果】KCl による収縮反応は各群で有意差はなかったが, 偽手術群と比較して BOO 群では術後 6 ヶ月で CCh 収縮の有意の減弱, 術後 2 週及び 3 ヶ月で ATP 収縮の有意の増強が見られた. EFS 刺激収縮については, 術後 3 ヶ月で低頻度刺激における反応性の有意の増強, 6 ヶ月で収縮の有意の減弱がみられた. また, ACh 及び ATP 放出は, BOO 群では術後 6 ヶ月で有意に減少していた. S100 蛋白染色陽性神経は主に筋層内に認められ, 閉塞の経過とともに陽性神経の減少が観察された. 【結論】BOO ラットにおいて, ACh 及び ATP 放出の変化がみられ, これが膀胱平滑筋の収縮に影響を及ぼしている可能性が示唆された.

O-4. ラット腎杯尿管標本における蠕動起始部位の検討

日本大学医学部生理学¹, 東京医科大学生理学第一², 名古屋大学大学院医学専攻細胞生理学³

山下 俊一¹, 小西 真人², 中山 晋介³, 國分眞一朗¹

ラット尿管を腎杯から一塊として取り出し, 蠕動の起始部位を観察した. 肉眼による観察では, 蠕動は腎盂の頭腹側, 頭背側, 尾腹側, 尾背側, 腎盂尿管移行部に 5 区分にした場合, それぞれ 25.0, 37.5, 16.1, 12.5, 8.9% で起始した. また, 我々の実験条件 (25°C, O₂ バブリング) では, 標本作成後実験終了までの間に蠕動起始部位が移動することはなかった. 蠕動のリズムは約 3 回/分を維持することができた. この標本を fluo3 で染色して観察した Ca²⁺ 濃度上昇の起始部位は, ほぼ蠕動運動の起始部位と一致しており, 蠕動運動と同様に下流に伝播した. このペースメーカー領域は複数の細胞から構成されており, 下流に伝播する Ca²⁺ 濃度上昇を発生する場合には複数の細胞が同期して Ca²⁺ 濃度上昇を起こす. しかしながら, いくつかの細胞は周期に同期せずに単独で Ca²⁺ 濃度上昇を起こすことがあった. 興味深いことに, ペースメーカー領域とは異なる部分において, 蠕動のリズムとは無関係に Ca²⁺ 濃度上昇を起こす領域が観察されることもあったが, 下流への伝播は発生しなかった. ギャップジャンクションの阻害剤であるヘプタノールを低濃度投与するとペースメーカー領域から下流への Ca²⁺ 濃度上昇伝播は阻害されたが, ペースメーカー領域の周期的活動は維持された. ヘプタノールを高濃度投与するとペースメーカー領域において細胞間の同期した Ca²⁺ 濃度上昇が失われた. これらの観察は, ペースメーカー領域では複数の細胞がギャップジャンクションで電氣的に結合することでペースメーカーとして機能していることを示唆する. 本手法を膜電位感受性色素による解析と組み合わせることで, より多くの情報が得られると考えられる.

O-5. α_{1d} アドレナリン受容体の分子薬理学的機能解析

新潟薬科大学薬学部薬理学

長友 孝文, 長岡 祐子

α_{1d} 受容体は主に前立腺や膀胱排尿筋に多く存在し, 下部尿路閉塞による過活動膀胱 (頻尿・尿意切迫など) に深く関与していると考えられている. 本研究はヒト α_{1d} 受容体を発現させた Human Embryonic Kidney (HEK293) 細胞における 4 つの薬物 (prazosin, tamsulosin, (+)-niguldipine, ketanserin) の置換力価評価と, コンピュータモデリングによって解析された tamsulosin と α_{1d} 受容体との結合部位を参考にしてアミノ酸配列を変異させた α_{1d} 変異受容体と薬物との親和性およびアンタゴニスト活性を結合実験法および Inositol Phosphates (InsPs) 産生実験法により評価し, リガンド結合部位を同定することを目的とした. Wild type 受容体との置換力値 (pKi 値) は prazosin \geq tamsulosin \gg ketanserin $>$ (+)-niguldipine, また pA_2 は prazosin $>$ tamsulosin \gg (+)-niguldipine $>$ ketanserin の順であった. D176A 受容体 (176 番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した変異受容体) においてはリガンドとの特異的結合は認められなかった. 一方, E237A 受容体 (237 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した変異受容体) の prazosin で pKi 値は有意に増加し, S258A 受容体 (258 番目のセリンをアラニンに置換した変異受容体) の prazosin や tamsulosin の pKi 値はともに有意に増加した. しかし, E237A 受容体および S258A 受容体における pA_2 値は, prazosin と tamsulosin とともに有意に低下した. 以上の結果から, コンピュータモデリングによって結合部位として推定された α_{1d} 受容体 D176A, E237A および S258A は, prazosin と tamsulosin の結合部位として重要であることが判明した.

O-6. モルモット胃輪走平滑筋の自発電気活動及び自動収縮におよぼす低酸素の影響

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞機能制御学

中村 江里, 横井 剛, 鈴木 光

消化管平滑筋は緩電位 (Slow wave) を律動的に発生し, これが胃の自発収縮を誘発している. 緩電位は筋間神経叢に分布するカハールの間質細胞において発生する歩調とり電位により発生すると考えられているが, その発生機序については不明な点が多い. 現在までに提唱されているいくつかの仮説によれば, 自発活動発生は歩調とり細胞内におけるミトコンドリアの活性と深く拘っている事が指摘されている. そこで, ミトコンドリア活性を変化させれば緩電位の発生頻度や自発活動の諸性質が変化するのではないかと推定されたので, モルモット摘出胃体部輪走平滑筋において低酸素素によりもたらされる自発活動の変化を電気生理学的手法を用いて調べた. 低酸素状態は生理塩溶液に酸素ガスの代わりに窒素ガス (5% CO₂ 含有) を 10-20 分通気することにより作成した. 輪走筋の収縮張力を等尺性に測定すると, 律動的は収縮が観察され, 低酸素状態にすると, 静止張力は一過性に増加した後低下し, それに伴い自発収縮の頻度増加と張力の減少が観察された. ガラス微小電極による細胞内電位記録で観察される緩電位の頻度もまた増加したが, その振幅や持続時間など電気活動の諸性質に著明な変化は観察されなかった. 高カリウムイオン溶液やアセチルコリンによる平滑筋の張力ならびに膜電位反応に及ぼす低酸素状態の影響について調べたところ, 収縮張力や細胞の電気活動に有意な変化は観察されなかった. シアン (酸化的リン酸化阻害剤) は自発活動の頻度を低下させ, その作用は低酸素状態で有意に促進された. 以上の結果から, 胃平滑筋の歩調とり細胞における自発活動は一時的な酸素濃度低下では容易に障害されないが, ミトコンドリア機能阻害薬の作用はより増強されることがわかった.

0-7. マウス小腸ペースメーカー電位の自発活動発生機序について

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞機能制御学

鬼頭 佳彦, 鈴木 光

近年, 消化管平滑筋の自発活動の源は筋組織内に分布するカハールの介在細胞 (interstitial cells of Cajal; ICC) であることが明らかになってきた。胃や小腸においては筋間神経層に分布し網目状のネットワークを形成している ICC-MY (myenteric ICC) がペースメーカー細胞と考えられている。この細胞は立ち上がり速度が速く, それに引き続くプラトー相から成るペースメーカー電位を発生し, この電位が受動的に輪走平滑筋に伝達されることでスローウェーブが発生することがモルモット胃幽門部において明らかにされた (Dickens *et al.* 1999)。一方, 小腸のペースメーカー電位に関してはマウス小腸由来培養 ICC-MY を用いた実験報告しかなく, 組織標本 (*in situ*) において ICC-MY がどのような電位変化を引き起こすのかについては知られていなかった。今回我々はマウス小腸ペースメーカー電位の測定に初めて成功したのでその電気生理学的性質について発表する。マウス回腸から幅約 0.5 mm, 長さ約 0.5 mm の小標本を作成し, ガラス微小電極によって ICC-MY の細胞内電位を測定した。ICC-MY は 1 分間あたり 20-30 回の頻度で振幅 50-60 mV, 持続時間約 1s, 最大立ち上がり速度約 1.5V/s のペースメーカー電位を発生していた。さらに各種阻害剤の投与による検討から, マウス小腸ペースメーカー電位はモルモット胃幽門部ペースメーカー電位と同様に 2 つの成分 (速い立ち上がり相とプラトー相) から成ることが分かった。速い立ち上がり相は電位依存性 Ca 透過性チャネルの活性化によるものであり, プラトー相は細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca 遊離によって引き起こされていると思われる。

0-8. マウス結腸基部粘膜下に分布する間質細胞の自発活動電位の性質

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞機能制御学

堀田 彩, 鬼頭 佳彦, 鈴木 光

マウス結腸基部には筋間神経叢に加え粘膜下にも一層の間質細胞が分布しており, その領域は P 領域と呼ばれ, 特殊な生理機能と関連していると考えられている。P 領域の粘膜下間質細胞は, c-Kit 陽性でプラトー型の活動電位を律動的に発生している。活動電位は, ニッケル感受性の立ち上がり相とそれに続くニフェジピン感受性のプラトー相から成り, その発生はミトコンドリア活性に伴う細胞内貯蔵部位からの Ca 遊離により誘発されると報告されている。本実験では, マウスから摘出した結腸基部の粘膜を除去した標本において, ガラス微小電極を用いて細胞から記録される活動電位の性質について調べた。活動電位は, 低 Cl 溶液 (イセチオン酸置換) や DIDS (Ca 感受性 Cl チャネル抑制薬) により発生頻度が減少し, そのプラトー成分が抑制されたので, この成分は Ca 感受性 Cl チャネル活性により形成されると考えた。外液の K 濃度を増加させると, 膜の脱分極に伴い活動電位の頻度が増加し, 振幅と立ち上がり速度が低下した。ミペフラジル (電位依存性 Ca チャネル) は活動電位の立ち上がり相と立ち下がり相を抑制し, プラトー電位を三角波形にした。DIDS は正常 K 濃度 (5.9 mM) 溶液中ではプラトー相のみを抑制したが, 高 K 濃度 (20 mM) 溶液による脱分極中では活動電位を消失させた。以上の結果から, P 領域の粘膜下間質細胞が発生する活動電位の立ち上がり相には電位依存性非選択性カチオンチャネルが, また, プラトー相には Ca 感受性 Cl チャネル活性が関与していることが示唆された。

O-9. 膀胱平滑筋収縮時における RyR2 機能の重要性

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, 東北大学大学院医学系研究科医化学²

堀田 真吾¹, 森村 浩三¹, 大矢 進¹, 村木 克彦¹, 竹島 浩², 今泉 祐治¹

平滑筋の収縮には細胞内全体の Ca^{2+} 濃度上昇が必要である。筋小胞体膜上の ryanodine receptor (RyR) からの Ca^{2+} 放出を誘発し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増幅する Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 遊離 (CICR) 機構が、平滑筋の興奮収縮連関機構にどの程度関与するかは、平滑筋組織によっても異なるかと推測され、まだ議論のあるところである。そこで、本研究では 2 型リアノジン受容体異型接合型ノックアウトマウス ($RyR2^{+/-}$) を用いて、膀胱平滑筋における収縮に対する $100 \mu\text{M}$ ryanodine の反応性について詳細に検討を行った。今回の実験では筋直接電気刺激の刺激条件を変えて収縮を発生させた。その結果、弱い刺激条件で生じた収縮は野生型マウス ($RyR2^{+/+}$) 及び $RyR2^{+/-}$ の両方において $100 \mu\text{M}$ ryanodine の投与により著明に減弱された。しかし $RyR2^{+/-}$ においては $RyR2^{+/+}$ に比べ減弱率が有意に低かった。一方、強い刺激条件で刺激した場合には $100 \mu\text{M}$ ryanodine 投与によって収縮力は有意に変化せず、 $RyR2^{+/+}$ と $RyR2^{+/-}$ で有意な差が無かった。一方、 $100 \mu\text{M}$ ryanodine は単離膀胱平滑筋において、比較的短い脱分極 (<30 ms) による電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) の活性化を介した電流は抑制しなかったが、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を強く抑制した。このような結果から、膀胱平滑筋は 1 発の活動電位発生時において VDCC を介した Ca^{2+} 流入だけでは十分な収縮は生じず、RyR2 を介した CICR が興奮収縮連関に必須であることが示された。又、脱分極刺激時間が長くなると、収縮をもたらす Ca^{2+} 濃度上昇に占める Ca^{2+} 流入の割合が大きくなり、RyR2 を介した遊離 Ca^{2+} の寄与の割合が減少することが明らかとなった。

O-10. 毛様体筋収縮調節に関与する受容体作動性陽イオンチャネルの分子本体の検討

旭川医科大学生理学第一¹, 名古屋大学医学部眼科²

高井 章¹, 宮津 基¹, 大日向 浩¹, 高井 佳子²

【目的】毛様体筋の持続的収縮に必要な細胞外からの Ca^{2+} イオン流入経路として機能するムスカリン受容体作動性非選択性陽イオンチャネルの特性を解析するとともに、その分子本体候補として注目される TRPC 型陽イオンチャネルの存在を検討する。【方法】ウシ単離毛様体筋細胞において電位固定法により全膜電流を記録。筋束における張力記録には等尺性トランスジューサーを使用。各種 TRPC の発現の検討には RT-PCR と免疫蛍光顕微鏡法とを併用した。【結果】カルバコール (CCh; 0.01 - $100 \mu\text{M}$) 投与により発生する電流のノイズ解析から、CCh が 2 種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35 pS) と NSCCS (100 fS)] を開口させることがわかった。外液陽イオンをすべて Ca^{2+} で置換しても CCh 刺激による電流発生は観察された。 Gd^{3+} や SKF96365 ($100 \mu\text{M}$) は両チャネル電流および収縮持続相を抑制した。RT-PCR によりウシ毛様体筋に TRPC1, 3, 4 および 6 の mRNA が検出された。短期培養した毛様体筋細胞の表面膜の細胞質側をこれらの TRPC の特異抗体を用いて蛍光染色すると約 $1 \text{ spot}/\mu\text{m}$ の抗体結合を認めた。【結論】ムスカリン受容体刺激に伴い NSCCL と NSCCS が開口。収縮持続相に必要な Ca^{2+} の流入経路を形成するものと考えられる。それらの有望な分子本体候補である TRPC のいくつかは筋細胞膜に発現していることが確認された。

O-11. 血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮を抑制する新規物質の同定

山口大学医学部医学科器官制御医科学分子細胞生理学¹, 山口大学医学部医学科4年生², 産業総合研究所 脂質工学研究グループ³

久本 仁美^{1,2}, 春木 貴史^{1,2}, 郭 鳳玲¹, 三輪さおり¹, 公文 保幸³, 中原 東郎³,
徐 丹¹, 加治屋勝子¹, 川道穂津美¹, 岸 博子¹, 小林 誠¹

Rho-kinase を介する血管平滑筋のカルシウム非依存性異常収縮は、血管攣縮などの血管病の原因として注目されている。当教室では、この Rho-kinase の上流のシグナル分子として、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) ⇒ Src ファミリーチロシンキナーゼ経路を同定し、血管攣縮における SPC の重要性について報告してきた。さらに、この病的なシグナル経路のみを特異的に阻害し、カルシウム依存性の正常な血管収縮には影響を与えない物質として、n-3 多価不飽和脂肪酸の一種であるエイコサペンタエン酸 (EPA) を同定した。現在、EPA は血管病の予防・治療薬として使われ始めている。しかしながら、EPA は、内服のみ可能であり、急性発症の血管病への対応が困難である。また、魚油から精製されるため、今後の供給安定性に不安がある。そこで、EPA に代わる新規の血管異常収縮抑制物質の探索を開始し、候補物質として、物質 A および物質 B を同定したので、報告する。ブタ冠状動脈平滑筋条片の張力測定を行ない、また、フラ 2 負荷血管条片を用いて、張力と細胞質カルシウム濃度の同時測定を行なった。SPC (30 μ M) は、細胞質カルシウム濃度を増加させることなく、長時間持続する収縮を引き起こした。SPC 刺激による収縮が最大になりかつ安定した時点で、物質 A、物質 B を投与した。物質 A、物質 B は細胞質カルシウム濃度を変えずに SPC による収縮を濃度依存性に抑制した。その抑制の程度は、EPA の抑制効果に匹敵するものであった。物質 A および物質 B の立体構造を検討してみると、一部 EPA との類似性が認められた。物質 A および物質 B には、安定した供給が得られるという利点があるので、将来、EPA に代わり、血管病の予防・治療薬として使用できる可能性がある。

O-12. 血管平滑筋収縮を抑制するエイコサペンタエン酸の作用機序

山口大学医学部医学科器官制御医科学分子細胞生理学

春木 貴史, 久本 仁美, 郭 鳳玲, 三輪さおり, 徐 丹, 加治屋勝子,
川道穂津美, 岸 博子, 小林 誠

正常な血管緊張を制御している血管平滑筋のカルシウム依存性収縮に対して、Rho キナーゼを介するカルシウム非依存性収縮は、血管攣縮などの血管緊張異常の本態であると考えられている。我々は、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) が、Src ファミリーチロシンキナーゼの活性化を介して、Rho キナーゼを活性化する事によって血管平滑筋の Ca^{2+} 非依存性収縮を引き起こす事を見出した。さらに、エイコサペンタエン酸 (EPA) が、Src ファミリーチロシンキナーゼを抑制する事によって、SPC/Rho キナーゼによるカルシウム非依存性収縮を抑制する事を見出した。今回の研究では、EPA の血管平滑筋収縮に対する作用を詳細に検討するために、SPC のみならず、U46619 (トロンボキサン受容体アゴニスト) および高 K 脱分極が引き起こす収縮と細胞質カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変化に対する EPA の作用を比較検討した。ブタ冠状動脈平滑筋条片にフラ 2 を負荷し、張力と $[Ca^{2+}]_i$ を同時測定した。SPC は $[Ca^{2+}]_i$ を増加させることなく血管平滑筋を収縮させたが、EPA は、 $[Ca^{2+}]_i$ には影響を与える事なく、SPC による収縮を抑制した。これに対して、EPA は、高 K 脱分極が引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ 増加と収縮には無効であった。また、EPA は、U46619 が引き起こす $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と収縮の両方ともほぼ完全に抑制したが、低濃度 (<30 μ M) の EPA では、 $[Ca^{2+}]_i$ は抑制されずに張力のみ抑制される傾向を示した。これらの結果より、EPA は Rho キナーゼを介するカルシウム非依存性収縮を抑制するのみならず、 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を抑制する事によって、カルシウム依存性収縮も抑制する事が解った。EPA による $[Ca^{2+}]_i$ 低下作用は、電位依存性カルシウムチャンネルではなく、受容体活性型カルシウムチャンネルの抑制によるものと考えられた。

O-13. 血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮における Fyn チロシンキナーゼの重要性

山口大学医学部医学科器官制御医科学分子細胞生理学

郭 鳳玲, 川道穂津美, 岸 博子, 苗 俊英, 三輪さおり, 徐 丹,
加治屋勝子, 小林 誠

血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮の主要なシグナル分子として Rho キナーゼ, プロテインキナーゼ C が注目されている。我々は, プロテインキナーゼ C 系とは独立して, Rho キナーゼを活性化して血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮を引き起こす分子として, スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定した。さらに, SPC が, Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) の活性化を介して, Rho キナーゼを活性化する事を見出したが, Src-TK の中でも, どのチロシンキナーゼ分子が関与しているかは不明なままである。本研究では, 血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮に関与しているチロシンキナーゼ分子を同定することを目的とした。血管平滑筋において, SPC は, カルシウム非依存性収縮, Src-TK と Rho キナーゼの活性化, および p60 蛋白のチロシンリン酸化を引き起こしたが, Src-TK 阻害薬 (PP1, PP2) は, これらの SPC による全ての反応を抑制した。SPC は, Src-TK の中でも Fyn を細胞質から細胞膜へ移動させたが, c-Src は移動させなかった。SPC は, ヒト冠動脈平滑筋の培養細胞を著明に収縮させたが, RNA 干渉 (siRNA) によって Fyn をノックダウンさせた培養細胞では, SPC による収縮が抑制された。RNA 干渉作用の無いコントロール siRNA を作用させても, SPC による細胞収縮には影響がなかった。 β エスシンによるスキンド血管平滑筋において, constitutively active Fyn は, カルシウム非依存性収縮を引き起こした。以上の結果から, Fyn チロシンキナーゼは, SPC による Rho キナーゼを介したカルシウム非依存性収縮において重要な役割を果たしていると考えられた。

O-14. prazosin 処置によるラット血管の α_1 -アドレナリン受容体サブタイプのスイッチング

福井大学医学部生命情報医科学薬理学

村松 郁延, 鈴木 史子, 山本はつみ, 田中 高志, 森島 繁

prazosin など α_1 -アドレナリン受容体遮断薬が長期間服用されると, prazosin の効果が次第に減弱する, いわゆるトレランスが観察される。この機序を明らかにするため, ラットに 2 週間 prazosin を投与し, α_1 -アドレナリン受容体の変動の有無を検討した。摘出したラット尾動脈の phenylephrine 反応は, prazosin 2 週間投与により supersensitivity を惹起した。対照ラットの phenylephrine 反応は, 主に α_{1A} -アドレナリン受容体を介して惹起されていたが, prazosin 処置により supersensitive となった反応は主に α_{1B} -アドレナリン受容体を介していた。同様な変化は, 経壁電気刺激による交感神経性反応でも観察された。組織片結合実験で α_1 -アドレナリン受容体サブタイプの変動を調べたところ, 対照ラットの尾動脈では α_{1A} -アドレナリン受容体が主に存在したのに対し, prazosin 処置では α_{1B} -アドレナリン受容体が有意に増加し, α_{1A} -アドレナリン受容体は減少していた。しかし, mRNA レベルでは, α_1 アドレナリン受容体サブタイプ間に変動を認めなかった。以上の結果より, prazosin を長期投与すると α_1 -アドレナリン受容体反応が supersensitive になること, この supersensitivity には α_1 -アドレナリン受容体のサブタイプレベルでのスイッチングが関与していることが示唆された。

O-15. 高コレステロール負荷マウスにおける腸間膜動脈の血管反応性の検討

星葉大医薬研機能形態

宮森 清人, 松本 貴之, 小林 恒雄, 鎌田 勝雄

糖尿病や高脂血症は種々の合併症を誘発するが、合併症は血管障害、中でも内皮細胞の機能障害から始まる。内皮細胞機能障害は酸化 LDL や superoxide anion など種々の因子が関与していると報告されているが、まだ詳細な機序は分かっていない。本研究では、高脂血症モデルにおいて血管の状態を superoxide anion に焦点を当てて検討した。(目的) 今回我々は、コレステロール含有特殊エサ負荷マウスの腸間膜動脈における血管反応性について検討を行った。(方法) 実験には ICR 系雄性マウスに、コレステロール 2%、コール酸 0.5% 含有した特殊エサの 12 週負荷により高コレステロール負荷マウス (HC) を作成し、同週齢の ICR 系雄性マウスを control 動物として用いた。腸間膜動脈はマウスを瀉血後摘出し、顕微鏡下で結合組織を剝離した後、長さ 2 mm のリング標本とした。標本は 95% O₂ + 5% CO₂ の混合ガスを通気し 37°C に保温した Krebs-Henseleit Solution 中に懸垂し、0.5 g の静止張力をかけて等尺性に反応を記録した。(結果, 考察) 高コレステロール負荷マウスにおいて phenylephrine (PE) による収縮反応の増強が観察された。この増強はフリーラジカル scavenger である tempol で改善され、NO 合成阻害薬による収縮反応は減弱していた。HPLC 法により plasma 中の NOx を測定したところ、NOx 及び NO₃/NO₂ の増加が確認された。今回の研究により高コレステロール負荷マウスの腸間膜動脈においては superoxide anions が増加し、NO 系に障害を与え、結果として PE 収縮を増強させている可能性が示唆された。

O-16. アセチルコリンは内皮細胞の K⁺ および Cl⁻ 電流を同時に活性化する

名古屋市立大学看護学部生理¹, 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞機能制御学²

山本 喜通^{1,2}, 鈴木 光²

血管内皮細胞はアセチルコリン (ACh) により過分極反応を示すが、この現象に関与する電流系を解明するため膜電位固定実験を行った。モルモット腸間膜動脈から内皮細胞層を剝離し、内腔膜面を上にして固定灌流し、これにパッチ電極による perforated whole-cell clamp を適用した。標本には互いにギャップ結合で電気的に連絡した多くの内皮細胞が含まれるため、先端直径 100 μm ほどのガラスピペットを押しつけることによって円周状に細胞を破壊し、中央に生き残った少数の細胞群を実験対象とした。スペースクランプの状況は近接する別の細胞に 2 本目のパッチ電極を適用し、電流固定下で膜電位を観察することで確認した。この標本での内皮細胞静止膜電位は 0 mV に近かったので、保持電位は 0 mV とし、5 秒おきに膜電位を -100 ~ +100 mV のランプ状に変化させ (持続は 500 ms)、各時点で流れる電流の I-V 関係を観察した。ACh は 0 mV で外向き電流を惹起し、その逆転電位は -50 mV 付近にあり、計算上の K⁺ 平衡電位 (E_K) とは一致しなかった。ACh で活性化される電流の逆転電位は DIDS で Cl⁻ 電流を抑制しておくとも E_K 方向に変化し、charybdotoxin and/or apamin によって K⁺ 電流を抑制しておくとも 0 mV 方向に変化した。これらのことから、ACh は血管内皮細胞の K⁺ および Cl⁻ 電流を同時に活性化することが示された。

O-17. 閉経モデルラットにおける内皮由来弛緩因子群の変化とその分子機構

北海道大学大学院医学研究科循環器病態内科学¹, 札幌医科大学医学部薬理学², 国立長寿医療センター研究所ラジオアイソトープ管理室³, 北海道大学大学院医学研究科細胞薬理学⁴

縄手 聡¹, 深尾 充宏², 滝川 修³, 三輪 聡一⁴

【目的】血管弛緩反応には, NO, PGI₂, EDHF の 3 種類の内皮由来弛緩因子が重要な役割を果たしている。閉経後女性における冠動脈疾患の増加はエストロゲンの抗動脈硬化作用が減少するためと考えられている。最近, エストロゲンの抗動脈硬化作用機序として, 脂質代謝改善作用以外の血管弛緩反応への関与が注目されている。本研究では, ラット閉経モデルの腸間膜動脈を使用し, これら弛緩因子の変化について検討した。【方法】40 週齢の雌性 Wistar ラットを偽手術群 (CON), 卵巣摘出群 (OVX), 卵巣摘出+エストロゲン補充群 (OVX+E2) の 3 群に分け, 4 週後に腸間膜動脈を摘出し, 内皮依存性弛緩反応および膜電位を測定した。さらに, eNOS, eNOS 活性調節蛋白である caveolin-1・calmodulin・hsp90 および EDHF 関連蛋白である connexin-43 の発現レベルを Western ブロットにより解析した。【結果】total の内皮由来弛緩反応は 3 群間で差を認めず, また, COX 阻害剤で影響を受けなかった。EDHF による弛緩反応及び過分極反応は OVX 群で減弱するとともに, EDHF 関連蛋白 connexin-43 も低下した。逆に, NO 由来弛緩反応は OVX 群で増強した。eNOS レベルは 3 群間で差を認めなかったが, その活性抑制因子である caveolin-1 が低下した。これらの変化は OVX+E2 群では回復した。【結論】卵巣摘出により, ラット腸間膜動脈における内皮由来弛緩反応は全体として変化しなかった。しかし, 内皮由来反応を個々に解析すると, EDHF 反応は低下し, NO 反応は増加していた。EDHF 反応の低下は connexin-43 の発現低下に, 一方, NO 反応の増強は eNOS 抑制因子である caveolin-1 の発現低下によると考えられた。

O-18. ヒト食道・胃における GABA_B 受容体局在についての検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学移植・消化器外科¹, 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科病態解析制御学医学薬理²

鹿島 泰洋¹, 上園 保仁², 円城寺昭人¹, 兼松 隆之¹, 谷山紘太郎²

【背景】最近, 逆流性食道炎の患者に対し, γ -amino butyric acid (GABA)_B 受容体アゴニスト baclofen による下部食道括約筋弛緩の抑制効果を利用した治療法が注目されている。GABA_B 受容体は GABA_BR1, GABA_BR2 というサブユニットがヘテロニ量体を形成することにより機能的受容体を構成する。更に R1 には R1a~g の 7 種類のサブタイプが存在することが知られている。【目的】ヒト消化管における GABA_B 受容体の局在については, 大腸を用いた我々の報告のみで (JPS 94:211 (2004)), 食道・胃における局在については報告がない。今回, 我々は食道・胃における GABA_B 受容体局在について検討を行った。【方法】当院にて行われた胃癌・食道癌手術症例の切除標本から, 上部食道, 下部食道, 胃噴門部, 胃体部の非癌部を切離, それぞれの組織より total RNA を抽出した。各 GABA_B 受容体サブタイプを特異的に増幅するプライマーを用いて Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を行い, 増幅産物の電気泳動を行った。また, 得られた結果をヒト脳での発現と比較した。【結果】上部食道, 下部食道, 胃噴門部, 胃体部において, 機能的 GABA_B 受容体を構成する R1a, 1b 並びに R2 の発現を認めた。また, R1 サブタイプは, 1d 以外の 1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 1g の発現を認めた。この発現様式は大腸で得られた結果と同一であったが, ヒト脳組織での発現とは異なるものであった。【結論】胃, 食道には機能的 GABA_B 受容体を構成するサブユニットが発現していた。R1 サブタイプの局在が消化管組織と脳で違っていることから, 消化管特異的に発現している R1 サブユニットが中枢とは違った作用を担っている可能性が考えられた。

O-19. 糖尿病性胃運動障害におけるエンドセリン受容体の役割

名古屋市立大学大学院医学研究科臨床機能内科学

加藤 岳史, 今枝 憲郎

【目的】糖尿病モデルラットを用いて胃自動運動に対する ET-1 の効果と ET レセプターの関係を検討した。【方法】SD ラットに Streptozotocin (STZ) を腹腔内投与し糖尿病モデルラット (STZ 群) を作製し, 同週齢の SD ラットをコントロール (C) 群とした。等尺性張力測定法で胃前庭部輪走平滑筋切片の自動運動を測定した。ET_B 受容体への作用は選択的作動薬の sarafotoxin S_{6c} (S_{6c}) を用い, ET_A 受容体への作用は選択的 ET_B 受容体拮抗薬である BQ788 の存在下に ET-1 を投与し, それぞれの効果を比較検討した。【結果】C 群 では S_{6c} (10 nM) は筋緊張度, 頻度, 振幅すべて有意に亢進したが, STZ 群では筋緊張度のみが亢進し, 頻度と振幅は亢進しなかった。BQ788 (1 mM) の存在下, ET-1 (10 nM) を投与したところ, C 群 (n=5) の筋緊張度 (前 019±0.03 g; BQ788 1.01±0.14 g, p<0.05) は有意に亢進したが, 振幅 (前 056±0.05 g; BQ788 0.38±0.04 g, p<0.05) は減弱した。しかし頻度は変化しなかった。STZ 群 (n=5) は筋緊張度 (前 013±0.02 g; BQ788 0.74±0.07 g, p<0.05), 振幅 (前 0.33±0.03 g; BQ788 0.82±0.08 g, p<0.05) が亢進したが頻度は変化しなかった。【結語】ET-1 はコントロールラットにおいて ET_B 受容体を介して自動運動の頻度を亢進し, ET_A 受容体を介して緊張度を亢進した。しかし糖尿病モデルラットでは S_{6c} は頻度を亢進しなかった。ET_B 受容体を介した反応経路の障害が糖尿病性胃運動障害の原因になっていると考えられた。

O-20. Growth hormone releasing peptide-2 (GHRP-2) の消化管運動及び食事摂取量に対する効果

東北大学医学部生体調節外科

藤 克昌, 柴田 近, 舟山 祐士, 福島 浩平, 高橋 賢一, 西條 文人,
長尾 宗紀, 羽根田 祥, 渡辺 和宏, 神山 篤史, 佐々木 巖

Growth hormone secretagogue (GHS) の生理的リガンドであるグレリンは, 消化管運動を亢進させ, 食事摂取量を増加させることが報告されている。しかし, 犬において, グレリンの消化管運動に対する効果はまだ明らかになってはいない。また, GHS の合成リガンドである, GHRP-2 の消化管運動に対する効果も明らかになっていない。今回我々は, グレリン及び GHRP-2 の消化管運動に対する効果, GHRP-2 の食事摂取量に対する効果を検討した。<方法>雑種成犬の, 胃体部・前庭部・十二指腸・空腸に strain gauge force transducer を縫着し, 2 週間の回復期間をおいた後, 意識下で消化管運動の測定を行った。空腹期の phase I に, グレリン 10 µg/kg, GHRP-2 0.5, 2.5 µg/kg, 生食コントロールを bolus で, 食事投与 90 分後に グレリン 40 µg/kg, GHRP-2 0.5, 2.5, 10 µg/kg, 生食コントロールを bolus で静注し, 消化管運動に対する効果を検討した。食事摂取量の評価は, 食事投与直前に GHRP-2 を 0.5, 2.5 µg/kg, 生食を bolus にて静注した後, 固形食を投与し, その後 2 時間の食事摂取量を計測した。また, 固形食投与 2 時間後に, GHRP-2 を 0.5, 2.5 µg/kg, 生食を bolus で静注した後 2 時間の, 固形食追加摂取量を計測した。<結果>空腹期 phase I に グレリン, GHRP-2 を投与しても, 消化管運動亢進効果は認められなかった。グレリンは食後期消化管運動に影響しなかったが, GHRP-2 は数分間の食後期上部消化管運動抑制効果を示した。GHRP-2 の食前投与は, 容量依存的に食事摂取量を増加させたが, GHRP-2 の食事投与 2 時間後の投与は, 食事量を変化させなかった。<結論> GHRP-2 は食事摂取量を増加させ, 食後期消化管運動を抑制した。一方, グレリンは犬の消化管運動に対して効果を示さなかった。

O-21. 胃排出能検査としての¹³C呼気試験標準法の有用性の検討

— Tmax 実測値と排出速度曲線の2峰化について —

川崎医科大学内科学食道胃腸科¹, 川崎医科大学検査診断学²

楠 裕明¹, 春間 賢¹, 畠 二郎², 鎌田 智有¹

【背景】われわれ数施設は、平滑筋学会ワークショップ案として液体試験食を用いた胃排出能標準検査法を発表した。これには18ポイント4時間法と10ポイント90分法があるが、90分法はTmax実測値のみをパラメータとしている。しかし、Tmax実測値は世界的に認知されたパラメータではなく、有用性の十分な検討がされていない。また、われわれは以前より体外式超音波(US)法を用いて、消化管運動機能を評価してきた。【目的】目的は、Tmax実測値の表す意味と排出速度曲線の2峰化の原因の解明を試みることである。【対象】健常人4例、排出遅延dyspepsia患者2例(平均年齢31.3歳)を対象とした。【方法】早朝空腹期に¹³C acetate Na塩100mgを混じたラコール200ml(200kcal)を経口投与し、標準案4時間法の18ポイントで呼気を採取し、Tmax実測値を含むパラメータを算出した。US法は前庭部横断面積を呼気試験と同じポイントで測定し、排出曲線を算出した。また、前庭部運動を可能な限り詳細に観察した。【結果】健常人と排出遅延患者のパラメータは、呼気試験とUS法とも排出遅延例で延長した。呼気試験のTmax実測値時には健常人では約50%、排出遅延例では約25%の試験食が排出されていた。排出速度が一定でない例ではTmax実測値と他のパラメータに乖離が見られた。また、投与直後にラコールは十二指腸に達し、一時的に前庭部運動が停止する現象が確認された。【結語】Tmax実測値は、試験食投与投与直後の不安定な排出動態を示す期間と安定した排出を示す期間の一部を含んだ時間を表す。Tmax実測値は簡便な排出能評価パラメータとして有用であるが、排出速度が著明に変化する特異な症例では、これのみでの評価は困難と思われた。排出速度曲線の2峰化は一時的な前庭部収縮の停止が関与している可能性が考えられた。

O-22. 簡易飲水試験法を用いたfunctional dyspepsia患者の病態診断の有用性について

東京慈恵会医科大学外科

中田 浩二, 川崎 成郎, 仲吉 朋子, 羽生 信義, 柏木 秀幸, 矢永 勝彦

近年、Functional dyspepsia (FD)の病態の一つとして内臓知覚過敏が注目されているが、本邦ではFD患者の内臓知覚検査の報告はわずかである。内臓知覚検査法としては、パロスタット法、粘膜電気刺激法、drink testなどが行われており、その中でもdrink testは簡便、非侵襲的な検査法として期待される。欧米で行われているdrink testの方法はmaximum satietyまで飲み続けるため、患者の身体的心理的負担も大きく日常診療の場に適用しうる簡便な検査法としての普及は難しいと考えられる。そこで飲水上限量を設定した飲水試験を考案しその有用性について検討した。「方法」健常人被験者54名とFD患者22名に対し飲水試験(体重[kg]×10 [ml]の水を5分間かけて均等な速度で飲水)を行い、出現した腹部症状の強さと持続時間をスコア化し(スコア0…症状なし or 軽度症状 [30分以内], スコア1…軽度症状 [30分以上] or 中等度症状 [30分以内], スコア2…中等度症状 [30分以上] or 強度症状 or 全量飲水不可)比較検討した。「結果」飲水試験でスコア1以上の患者の割合は健常人被験者37%、FD患者77%(p<0.05)とFD患者群において有意に高頻度であった。「結語」飲水試験は容量負荷に対する消化器症状の有無と程度を調べる方法で胃適応弛緩、胃排出能、内臓知覚、飲水した水の消化管内分布などに影響されると考えられる。飲水試験は簡便、非侵襲的、安価に行え、日常診療への導入も容易であることから、FD患者の新たな病態診断法として有用である。

O-23. 迷走神経・下部食道括約筋・幽門括約筋温存胃垂全摘術兼J型空腸嚢間置術後 QOL に対するクエン酸モサブリドの有用性

日本歯科大学歯学部外科学¹, 日本大学医学部外科学小児外科², 日本大学医学部救急医学³

富田 涼一¹, 池田 太郎², 五十嵐誠悟², 丹正 勝久³, 越永 従道²

【目的】早期胃癌における括約筋温存術式である迷走神経・下部食道括約筋・幽門輪温存胃垂全摘兼有茎J型空腸嚢間置術後では、食後腹部膨満感を訴える症例が多い。そこで消化管運動改善剤であるクエン酸モサブリドの本術式施行前後でその有用性をQOLから検討した。【対象と方法】M癌でN0症例に対して行われた迷走神経・下部食道括約筋・幽門括約筋温存胃垂全摘術兼J型空腸嚢間置術後症例(D1,根治度A)12例(男性9例,女性3例,44~70歳,平均58.1歳)である。モサブリド15mg/日(1か月連続経口投与)投与前(A群),投与後(B群),投与中止後1か月目(C群)の臨床症状を比較検討した。【成績】食欲;A群はB群より有意に低下し($p<0.05$),C群はB群より低下傾向を示した($p<0.1$)。1回あたりの食事摂取量;A群はB群より,C群はB群より有意に少なかった(それぞれ, $p<0.01$, $p<0.05$)。食後腹部膨満感;A群はB群より,C群はB群より有意に多く認めた(それぞれ, $p<0.001$, $p<0.01$)。逆流性食道炎症状と早期ダンピング症候群;A,B,C群の全例に認めなかった。【結論】迷走神経・下部食道括約筋・幽門輪温存胃垂全摘兼有茎J型空腸嚢間置術後では、腹部膨満感を訴え、経口摂取が制限される症例を認めた。しかし、モサブリドを服用することで腹部膨満感は消失しQOLの改善を認めた。

O-24. 難治性胃食道逆流症(GERD)に対する噴門スコアの検討

明舞中央病院内科¹, 鐘紡記念病院和漢診療科², 山本クリニック³, 近畿大学東洋医学研究所⁴

高屋 豊^{1,4}, 新澤 敦², 二宮 裕幸², 山本 篤³, 森山 健三⁴, 田原 英一⁴, 新谷 卓弘⁴

目的:噴門を内視鏡的に観察し、その噴門の弛緩の程度をスコア化し、胃食道逆流症(GERD)との関連を検討した。緒言:第21回和漢医薬学会大会で難治性GERDに東洋医学的な氣の失調が深く関わっており、特に氣逆および氣虚とGSRSスケールの酸逆流スケールとの相関性を明らかにし、GSRSスケール上、改善している症例中の過半数に未だ氣虚が改善していないことを報告した。氣虚病態では高率に内臓下垂を伴うことが知られており、胃下垂があると噴門のHis角が鈍化し、この結果、逆流防止機構が障害されることによりGERDが難治化することが推察された。これを証明するべく噴門の弛緩状態をスコア化し、GSRSスケール、寺澤の氣のスコアとの対比を行った。対象と方法:プロトンポンプ阻害剤(PPI)でコントロール良好で、H₂受容体拮抗剤(H₂RA)でコントロール不良な難治性GERDを対象として、臭化プテリスコポラミン20mg筋注後、内視鏡的にJターンで噴門を観察し、噴門の弛緩程度をスコア化した。噴門スコアは、0:胃粘膜が内視鏡に絡みついており、噴門部と内視鏡との隙間は全く無い、1:噴門部にわずかに隙間が認められる、2:噴門部は開大しているが、その口側はしっかり閉じている、3:噴門部は開大し、その口側の食道を十分に観察できる、4:明らかな食道裂孔ヘルニアが認められる、に分類し検討した。結果:難治性GERD40例では、噴門スコア1が2.5%(1例),2が17.5%(7例),3が45.0%(18例),4が35.0%(14例)であった。GSRSスケールの酸逆流スケールは 3.21 ± 1.48 、氣虚スコア(30点以上が陽性) 52.8 ± 17.8 と高値であった。考察:難治性GERDにおいては食道裂孔ヘルニアを明らかに伴わない噴門スコアの2と3の総和が高率であり、機能的ではなく器質的な噴門異常がGERDを難治にしている事が示唆された。今後は噴門スコアと臨床症状の関連を確認する目的でこれらのスコアとの相関性をGERD患者全般を対象に探索する予定である。

O-25. DMD 患者の胃電図周波数の摂食前後における統計処理による検討

国立病院機構あきた病院¹, 秋田大学工学資源学部²

猪又 八郎¹, 大石 洋平², 井上 浩², 小林 顕¹

【目的】一般に筋ジストロフィー症では消化器運動機能障害が主要合併症の1つとして指摘されている。今回デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)患者を対象にして胃腸部位の胃電図観察を試み、平滑筋組織の電気活動の性状について、周波数の経時変化に焦点をおき、摂食負荷前後の周波数変動を測定し、統計処理により比較検討を行った。【対象と方法】DMD患者の胃電図を、ニプロ胃電計EGを用いて4電極法による電極配置で計測した。被験者はDMD患者6名(25.7±6.1歳)である。計測開始から30分から60分後に固形(半流動食)を摂食させ、さらに60分から90分にわたり計測を続けた。計測した胃電図は1区間250秒毎に分け、10秒ずつずらしてフーリエ解析し、各区間のうち最も振幅が最大の周波数(F_{max})と経過時間の推移(ドミナントグラフ)を求めた。そして、 F_{max} が摂食前と後で発生した割合を表した発生頻度分布(ヒストグラム)を求め、最も頻度の高い周波数を F_{maj} と定めた。【結果】時間一周波数解析の結果、ドミナントグラフによると、DMD患者は健常者に比べて、胃電図周波数が時間経過とともに激しく変動することが示され、健常者よりも0.03 Hz以下の異常な周波数が多く発生していた。ヒストグラムで見ると、健常者は F_{maj} の頻度が大きく、分散が小さいのに対して、DMD患者は F_{maj} の頻度が小さく、 F_{maj} 以外の周波数との差が小さい、分散が大きい、という相違がみられた。また、健常者は摂食後にヒストグラムの分散が大きくなる傾向があるが、DMD患者は摂食前からヒストグラムの分散が大きい。摂食前後における F_{maj} は健常者では0.004 Hz以内で変化するが、DMD患者は F_{maj} の変化が大きかった。ただし、健常者を対象とした摂食前後のドミナントグラフおよびヒストグラムの特徴については第44回日本生体医工学大会(2005)で報告した。

O-26. アクチン結合タンパク質のアクチン・トロポミオシン結合部位由来ペプチドがスキンド平滑筋弛緩に与える影響

東京医科大学医学部生理学第一¹, 東京医科大学医学部脳神経外科学², 九州大学大学院医学研究院臨床薬理³

渡辺 賢¹, 吉野 恭正¹, 橋本 亮^{1,2}, 森本 幸生³

最近、アクチン・トロポミオシン結合タンパク質(カルデスモンなど)は、平滑筋の収縮過程よりも弛緩過程を変調することが明らかになってきた(例えばAlbrechtら, 1997)。そこで、アクチン・トロポミオシンに作用して平滑筋収縮を変調することが知られる、横紋筋トロポニンI抑制領域(心筋型: 領域136-147)由来ペプチド(TnIp; Ac-GKFKRPTLRRVR-NH₂)とヒト熱ショックタンパク質20アクチン・トロポミオシン結合領域(領域110-121)由来ペプチド(HSP20p; Ac-GFVAREF-IIRRYR)が、スキンド平滑筋弛緩過程に与える影響を検討した。昨年の本総会で報告したように、TnIpはCa²⁺除去によって惹起される弛緩時にその初期相を短縮する一方で、続く緩徐相を延長した。解離しつつあるクロスブリッジの一部がラッチブリッジに移行すると仮定すると、TnIpはクロスブリッジ解離を促進すると同時に、早いクロスブリッジからラッチブリッジへの移行も促進することが考えられる。一方、HSP20pは弛緩過程の全経過を延長した。HSP20pは、クロスブリッジ解離延長とラッチブリッジ移行に働くことが示唆された。

O-27. Heat shock protein 20 由来ペプチドの平滑筋収縮タンパク質活性変調効果の構造活性相関

東京医科大学医学部生理学第一¹, 九州大学大学院医学研究院臨床薬理²

吉野 恭正¹, 渡辺 賢¹, 森本 幸生²

Heat shock protein 20 (HSP20) はアクチン結合能を持ち, そのアクチン結合部位 (残基 110-121 GFVAREFHRRYR) はトロポニン I 抑制領域 (心筋; 残基 136-147 GKFKRPTLRRVR) と同源性が高い. 我々はこのアクチン結合部位由来の合成ペプチド (HSP20_{p110-121}) がモルモット盲腸紐平滑筋スキンド標本において, Ca²⁺ 活性化最大収縮を抑制する一方で, 収縮の Ca²⁺ 感受性を増強することを見いだした (第 45 回日本平滑筋学会総会で発表). 昨年の本会ではこの HSP20p のスキンド平滑筋に対する二相性効果のメカニズムは, HSP20p がミオシン軽鎖リン酸化を促進する一方で, クロスブリッジに直接的に働きアクチン-ミオシン相互作用を抑制することに因ることを発表した. 今回我々はこの HSP20p の二相性効果の構造活性相関を調べる目的で, HSP20p の 12 個のアミノ酸残基を 1 残基毎にグリシンに置換した 11 個の HSP20p アナログ (F111G, V112G, A113G, R114G, E115G, F116G, H117G, R118G, R119G, Y120G, R121G) を合成し, Ca²⁺ 活性化収縮に対する各アナログの効果を検討した. 結果は R114G, H117G, R118G, R119G, Y120G の 5 種類のアナログは Ca²⁺ 感受性に関与しなかったが, その他のアナログは Ca²⁺ 感受性の増強効果を示した.

O-28. MYH9 異常を伴わない May/Hegglin 異常症の病態機構の検討

北里大学医学部血液内科学¹, 杏林大学医学部解剖学第 2², マサチューセッツ大学医学部生理学³

宮崎 浩二¹, 渡辺真理子¹, 片山 卓爾¹, 川上 速人², 池辺 光男³, 東原 正明¹

昨年われわれは本学会総会にて, May-Hegglin 異常症の病態分子機構を解析し報告した. 非筋ミオシン重鎖 MYH9 の尾部の異常がミオシンフィラメントの可溶化を妨げることにより, 本疾患に特異的な細胞質封入体を形成し, 巨核球の血小板産生にも影響を及ぼすことが推測された. 今回は, MYH9 分子に変異を認めないものの臨床的には典型的な May-Hegglin 異常症の症例の病態について検討した. 本症例の末梢血塗抹標本では, 白血球に典型的な細胞質内封入体および巨大血小板を認めた. また, その封入体は血小板ミオシン抗体で染まるため非筋ミオシンからなることが分かった. しかしながら電子顕微鏡では典型的な縦方向に走る線維状の構造物は認められず粗面小胞体の重なったものであった. 本症例末梢血単核球から DNA を抽出し MYH9 の全エキソンおよびイントロンとの境界領域の塩基配列を調べたところ異常は認められなかった. 20-kDa ミオシン軽鎖についても検索したが正常配列であった. 本症例の原因としてミオシンフィラメントに関係する蛋白質や MYH9 異常を伴わない May-Hegglin 異常症に異常がみられたとの報告のあったフィンプリンについても検索中である. ミオシンの先天異常症を研究することはミオシン分子の生体内での役割を解明する上において重要であると考えられる.

O-29. 胃平滑筋の $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange 機構と NCX isoform 発現の特徴

昭和大学保健医療学部生理学¹, 島根大学医学部環境生理学², 福岡大学医学部薬理学³

坂井 泰¹, 橋本 道男¹, 岩本 隆宏¹

【目的】 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) は形質膜に存在し、細胞内外の Na^+ 濃度勾配を利用して細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ排出する機構である。今回、胃底部平滑筋弛緩機構に着目し、胃底部平滑筋と胃幽門部平滑筋における NCX isoform の発現と Ca^{2+} 調節機構について検討した。【方法】: モルモット胃を摘出後、底部および幽門洞部を分離し、粘膜剝離後平滑筋条片の等尺性収縮を記録するとともに、ウエスタンブロッティング法により NCX1, NCX2 の発現部位の特徴を観察した。胃底部からは形質膜を分離し、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ によるトレーサー実験により検討した。【成績】: K^+ 除去液交換後、胃底部では徐々に収縮が発生したが、幽門洞部では殆どこの収縮は観察されなかった。Ouabain ($10\ \mu\text{M}$) を作用させると、胃底部では徐々に収縮が発生したが、幽門洞部では一過性の収縮が惹起されその後弛緩に転じた。NCX1 は幽門洞部および胃底部に発現したが、NCX2 は胃底部の発現量が有意に多かった。NCX の発現量と $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange 機構の関係を明らかにするため、胃底部から分離した形質膜を用いた。分離膜の電子顕微鏡像は小胞状であり、 $5'$ -nucleotidase 活性および ATP-dependent Ca^{2+} uptake. 活性が最も高かった。 Na^+ 負荷形質膜の Na^+ 依存性 Ca^{2+} uptake は Ca^{2+} 濃度依存性 ($10\ \mu\text{M}\sim 500\ \mu\text{M}$) であり、この uptake は Na^+ イオノフォアであるモネンシンで完全に阻害された。形質膜小胞からの Ca^{2+} 放出は外液 Na^+ により促進されたが、この放出はカチオンイオノフォアであるグラミシジンにより有意に阻害された。【結論】: 胃底部には NCX2 が多く発現し、 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange 機構により細胞内 Ca^{2+} が過剰に増加しないように胃底部の弛緩維持に関与していると推察した。

O-30. 炎症性サイトカインによる CPI-17 発現抑制を介した消化管平滑筋運動機能障害

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学

大濱 剛, 堀 正敏, 尾崎 博

【背景と目的】我々は、炎症性腸炎疾患発症時に認められる消化管運動機能障害の分子機構の一つとして、IL- 1β による脱リン酸化酵素阻害蛋白質 CPI-17 の発現量低下を介した収縮蛋白系の Ca 感受性増加機構の抑制が重要であることを、回腸筋組織培養法による in vitro の系で提唱した (J. Biol. Chem. 2003, 278)。本研究では、腸炎モデル動物においても CPI-17 の減少が認められるか検証するとともに、炎症性サイトカインによる CPI-17 の発現抑制機構について解析した。【成績】TNBS 誘発回腸炎モデルラットにおいて、筋層炎症部の CPI-17 発現量は減少し、カルバコール (CCh) 刺激による収縮も減弱した。このとき、筋層部での $\text{TNF}\alpha$, IL- 1β および IL-6 の発現量は上昇していた。しかし、 $\text{TNF}\alpha$ および IL- 1β 処置をしたラット回腸筋組織培養標本においてのみ、CPI-17 発現量の減少と CCh 収縮の抑制が認められた。 $\text{TNF}\alpha$ 欠損マウスから摘出した回腸筋組織培養標本では、IL- 1β による CPI-17 の減少と収縮張力の抑制は消失した。一方、IL- $1\alpha/\beta$ 欠損マウスから摘出した回腸筋組織培養標本では、 $\text{TNF}\alpha$ による CPI-17 の減少と収縮抑制は消失しなかった。さらに、TNBS 誘発腸炎モデルにおいても、 $\text{TNF}\alpha$ 欠損マウスでは炎症による CPI-17 発現量低下は消失したが、IL- $1\alpha/\beta$ 欠損マウスでは発現量が低下した。【結論】CPI-17 は in vivo の回腸炎モデルにおいても消化管運動機能障害機構の重要な因子と考えられた。また、発症時の CPI-17 発現量低下には、 $\text{TNF}\alpha$ が必須であり、IL- 1β は $\text{TNF}\alpha$ の下流に位置して消化管運動機能障害に関与していることが示唆された。謝辞: IL- $1\alpha/\beta$ 欠損マウスをご提供頂いた東大医科学研究所、岩倉洋一郎教授に感謝致します。

O-31. TNBS 誘発腸炎モデルにおける筋層部炎症応答と運動機能障害

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学

清末 正晴, 堀 正敏, 尾崎 博

【背景と目的】炎症性腸疾患における消化管運動機能障害機構を明らかにするには、消化管筋層部での炎症応答を解析することが重要である。本研究は、TNBS 誘発結腸炎モデルラットを用いて、腸炎に伴う消化管筋層部炎症応答と消化管運動機能障害との関係について解明することを目的とした。【結果】TNBS 投与 2 日後において、粘膜上皮は脱落し、多数の炎症性細胞の浸潤が粘膜と筋層に認められた。TNBS 投与 7 日、14 日と次第に炎症像は軽減した。TNBS 投与 2 日目では、粘膜と筋層の両者で顕著な MPO 活性の上昇が認められたが、筋層部での MPO 活性は粘膜部のおよそ 1/10 であった。MPO 活性はその後急速に減弱したが、TNBS 投与 14 日目でも有意に増加していた。TNBS 投与 2 日目には、各種炎症性サイトカインの mRNA 発現は、粘膜部と同様に筋層部においても顕著に増加していた。しかし、これらの mRNA 発現は TNBS 投与後 7 日目では元のレベルまで低下した。一方、TNBS 投与 2 日目からカルバコール収縮は顕著に抑制され、この抑制は TNBS 投与 14 日目でも全く回復しなかった。これに対して、平滑筋の自発性収縮頻度は TNBS 投与 2 日目では消失していたが、14 日目ではほぼ完全に回復した。TNBS 投与 2 日目、7 日目では、ckit 陽性の ICC のネットワークも崩壊していたが、TNBS 投与 14 日目ではネットワークの回復が認められた。【考察】TNBS 誘発腸炎において粘膜部に匹敵する炎症応答が筋層部に存在することが明らかとなった。炎症性メディエーターの発現は病態初期でのみ上昇していた。筋原性の収縮能と ICC 依存性の自動能の障害は、この炎症性メディエーターの発現に対応して生じたが、自動能は炎症性メディエーターの消失とともに回復するのに対して、筋原性の障害は炎症性メディエーターの消失した後も長期にわたり回復しないことが明らかになった。

O-32. 過敏性腸症候群における CRH 拮抗薬の大腸知覚・運動機能への効果

東北大学病院心療内科¹, 東北大学病院総合診療部², 東北大学医学部行動医学³

相模 泰宏¹, 本郷 道夫², 福土 審³

〔背景〕Corticotropin-releasing hormone (CRH) の末梢投与で大腸運動機能は亢進する。また CRH 投与による大腸機能の変化は健常人よりも IBS 患者にて有意に亢進する。〔目的〕過敏性腸症候群 (IBS) で、CRH 拮抗薬 α -helical CRH の末梢投与が大腸運動・知覚機能に与える影響を検討する。〔対象〕20~30 代の健常人 10 名、IBS 10 名。〔方法〕バロスタットバッグと大腸内圧測定用カテーテルを下行~S 状結腸に挿入、直腸に粘膜電気刺激用カテーテルを留置し、その後安静臥床とし安静期、電気刺激期 (electrical stimulation: ES)、回復期での motility index (MI)、バッグ容量による大腸 tone、自覚症状の変化、ACTH、cortisol の血中濃度を CRH 拮抗薬 α -helical CRH 非投与時、投与時 (α -helical CRH; 10 μ g/kg d.i.v.) で比較検討した。バロスタットバッグは圧感覚閾値の測定時以外は 10 mmHg で加圧した。〔結果〕1) IBS において、薬物非投与時の ES で MI は健常人に比べ有意に亢進したが CRH 拮抗薬投与時は有意差は認められず。2) 健常人では CRH 拮抗薬投与後にバッグ容量が有意に増加したが IBS では有意な増加は認められなかった。3) IBS で ES での腹痛、不安感の強度が CRH 拮抗薬投与後に有意に改善した。4) ACTH、cortisol は両群で有意な変化をしめさなかった。〔結論〕CRH 拮抗薬 α -helical CRH の末梢投与は、HPA axis へ影響を及ぼさない投与量で IBS の大腸電気刺激時の機能変化および随伴症状を抑制した。

P-1. 雌性ラットの腹部大動脈狭窄による心肥大形成に対する卵巣摘出の影響

東北大学大学院薬学研究科薬理学

阿部 智大, 福永 浩司

[目的] 心疾患の罹患率には性差があることが知られており, 男性よりも女性のほうが心疾患の罹患率が低い. しかし, 女性でも更年期に差し掛かると心疾患の罹患率が増加し始め, やがて男性との性差は消失する. これらのことから, 心疾患に対し女性ホルモンが保護的に働いていると考えられている. 本研究では, 心肥大形成に対する女性ホルモンの影響を明らかにする. [方法] 実験には Wistar 系の雌性ラットを用い, 6 週齢で卵巣を摘出し 8 週齢で腹部大動脈を狭窄させ, 12 週齢で心臓を摘出し, 心重量と心肥大誘導の関わるカルシウムシグナル系について調べた. また, 心臓を摘出する直前に心機能を測定した. 偽手術群と卵巣摘出し腹部大動脈狭窄を行っていない群をコントロールとした. [結果と考察] 心臓に圧負荷をかけたラットでは心重量と共に活性型カルシウム/カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II δ (CaMKII δ) の量が有意に増加した. 卵巣摘出のみでは心重量の増加は認められなかったが, 卵巣摘出後に圧負荷をかけたラットでは圧負荷をかけた群と同様に有意な心重量の増加と, 活性型 CaMKII δ 量の増加が認められた. しかし, 圧負荷をかけた群と比較して心機能の低下や拡張末期圧の上昇が認められた. さらに, 卵巣摘出後に圧負荷をかけたラットにおいては心重量と CaMKII δ の発現量及び活性型 CaMKII δ 量の間に関連性が見られた. 以上の結果は CaMKII δ が心肥大形成の素過程に関与するというこれまでの報告と一致している. 今後は, 心肥大からの心不全への移行にどのようなカルシウムシグナルが関与するのかを明らかにする. さらに, カルシウムシグナルの異常を抑制して心肥大と心不全の発症を防ぐ創薬を目指し研究を進めて行く.

P-2. 酸性 pH によるラット冠動脈の環流圧の増加のメカニズム

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学¹, 弘前大学医学部薬理学²

洞井 康¹, 古川 賢一², 岩田 慎吾¹, ローラ ディリーブ・クマール¹, 山国 徹¹, 大泉 康¹

[目的] 冠動脈は低酸素状態によって起こる心臓病に深く関わっている. 酸素の供給が不十分になると, 血液が酸性化して心臓, 血管などの循環器に障害が起きる. そこで, ランゲンドルフ心臓標本を用いて環流液の pH の変化が冠動脈に与える影響を検討した. また, その分子機構を解明するため, チロシンリン酸化の関与について検討した. [方法] ラットから心臓を摘出後, ガラスカニューレを胸部大動脈に挿入してランゲンドルフ装置に装着した. Krebs-Ringer 液を一定の流速で環流し, その環流圧を圧トランスジューサーを用いて測定を行なった. チロシンリン酸化は, ウェスタンブロット法により検討した. [結果] 環流液の pH をアルカリ性になると, Wistar-Kyoto ラット (WKY) は, 自然発症高血圧ラット (SHR) と同様に環流圧が増加した. 一方, 環流液の pH を酸性にすると, 環流圧が増加したが, SHR のそれは WKY に比べより顕著に認められた. 酸性 pH による環流圧の増加は, verapamil, cromakalim および adenosine により抑制された. WKY に N-nitro-L/arginine を投与して血圧を上昇させると, 酸性 pH による環流圧の増加は著しく増強された. SHR の摘出胸部大動脈においても同様に酸性 pH により顕著な収縮反応が認められ, その反応は PI3 キナーゼ阻害薬で抑制された. また, PI3 キナーゼは酸性 pH により, チロシンリン酸化が促進された. [考察・結論] 以上の結果から, ラット冠動脈における酸性 pH による収縮は, 電位依存性 Ca チャンネルを介した Ca 流入により起きること, また, その収縮には PI3 キナーゼのリン酸化が関与していることが明らかとなった.

P-3. ラット胸部大動脈平滑筋におけるエンゴサク由来成分 stylopine の弛緩作用

東北大学大学院薬学研究科分子生物薬学

内田 圭祐, 斉藤 真也, 田中 正志, 李 玉山, 大泉 康

エンゴサク *Corydalis Tuber* は、古来より鎮痛・鎮痙胃腸薬、消化器潰瘍治療薬として常用されてきた。エンゴサクはベルペリン骨格を有するアルカロイドを数多く持つことが報告されているが、それらの薬理作用についてはまだ知られていないことが多い。そこで本研究では、ラット胸部大動脈平滑筋標本を用いてエンゴサクの成分の1つである stylopine の薬理作用の解析を行った。平滑筋標本を用いた張力測定において、stylopine は norepinephrine 及び高濃度 K^+ 液誘発性収縮を濃度依存的に弛緩させたが、norepinephrine 誘発性収縮に対してより顕著な弛緩作用を示した。また、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fura-2 を負荷した標本で細胞内 Ca^{2+} 動態を測定した結果、stylopine による弛緩作用は細胞内 Ca^{2+} 濃度の減少を伴っており、norepinephrine により上昇した細胞内 Ca^{2+} 濃度をより顕著に減少させた。この傾向は、forskolin による弛緩作用と類似していた。そこで、細胞内 cAMP 含量の変化について検討したが、stylopine で刺激した標本は対照標本と比較して cAMP 含量の増加は認められなかった。また、PKA の関与を検討するために、抗 phospho-PKA substrate 抗体を用いて Western blotting を行った結果、stylopine 単独で刺激した標本では、PKA の基質となりうるタンパク質のリン酸化の亢進はわずかし認められなかったが、forskolin と併用して刺激した標本では、リン酸化の亢進が認められた。以上の結果から、stylopine はラット胸部大動脈において弛緩作用を持ち、その作用は PKA 活性の上昇により引き起こされているものの、cAMP 含量の増加による作用ではないことが示唆された。

P-4. ヒト胎盤および大網血管の収縮調節機構の比較

東北大学医学部周産期医学

今井 紀昭, 斉藤みのり, 菅原 準一, 木村 芳孝, 岡村 州博

胎盤血管は神経支配を受けていないため、胎盤循環調節には内因性の血管作動性物質が大きな役割を担っていると考えられている。そこでヒト胎盤の絨毛膜板内小動脈を用いて血管作動性物質に対する反応を検討し、さらに体血管である大網小動脈の反応と比較した。正期産で合併症のない妊婦の胎盤 (12 例) と卵巣癌患者より切除した大網 (4 例) から内皮細胞の付着した血管標本を作製し、wire myograph (DMT, Denmark) を用いて norepinephrine (NE), arginine vasopressin (AVP), U46619 (thromboxane A2 mimetic) に対する用量反応曲線を描出した。また U46619 収縮に対する acetylcholine (ACh), bradykinin (BK), histamine (His) の弛緩反応を検討した。さらに NO 合成酵素阻害薬 (L-NAME) 存在下における BK と His の弛緩反応についても検討した。胎盤血管の最大収縮は $U46619 > AVP > NE$ の順だった。ACh による U46619 収縮の弛緩反応は両血管でほとんど見られなかった。BK により体網血管で 91%、胎盤血管で 29% の弛緩反応が見られた。L-NAME 前処置により大網血管の弛緩反応は影響を受けなかったが、胎盤血管の反応は 3% まで抑制された。His により大網血管は 80% の弛緩反応が得られたが、胎盤血管では弛緩反応は見られなかった。L-NAME 前処置は大網血管の反応に影響しなかったが、胎盤血管では弱い収縮反応が見られた。この収縮は H_1 受容体阻害薬 (chlorpheniramine) により抑制された。今回の研究では、胎盤小動脈における BK の弛緩反応がはじめて確認され、この弛緩反応では NO を介した経路が大網血管と比べより重要であると考えられた。また、胎盤小動脈における His の反応には、大網血管ではみられない H_1 受容体を介した収縮反応が認められた。以上の結果から、胎盤小動脈の収縮調節機構は体血管とは異なることが示唆され、これを解析することは胎児胎盤循環調節を解明する上で重要であると考えられた。

P-5. ラット大動脈平滑筋細胞に対する EDG 受容体活性化薬の効果と EDG 受容体の発現変化

名古屋市立大学大学院薬学研究所細胞分子薬効解析学

田中 良一, 大矢 進, 村木 克彦, 今泉 祐治

【目的】脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸(S1P) やリゾフォスファチジン酸(LPA) は, endothelial differentiation gene (EDG) 受容体を介し血管平滑筋 (VSM) において細胞増殖, 細胞遊走作用などを示すことが報告されている. VSM には数種の EDG 受容体が発現し, これらの受容体の活性化がその生理機能の調整に関与すると考えられるが, いまだ不明な点が多い. そこでラット大動脈平滑筋細胞 (ASMC) を用いて, S1P および LPA の細胞内 Ca 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する効果及び ASMC に発現する EDG 受容体について検討した. 【方法】Wistar 雄性ラットから大動脈を摘出し, 酵素法により平滑筋細胞 (ASMC) を得て, 細胞培養を行った. この細胞を用い脂質メディエーターによる $[Ca^{2+}]_i$ 変化及び, RT-PCR 法により EDG 受容体の発現を検討した. またタプシガルゲンにより細胞内 Ca ストアを枯渇させたときに活性化される容量性 Ca 流入 (SOC) に対する脂質メディエーターの効果について検討した. 【結果】ウシ胎児血清 (FCS) 存在下において細胞培養を行ったところ, ASMC における S1P 誘発 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇効果は, 摘出直後に比べ培養することにより増加した. また反応細胞数も有意に増加した. 一方 LPA 誘発の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇効果及び LPA に反応を示す細胞数は細胞培養により変化しなかった. RT-PCR 法により S1P 受容体である EDG-1, -3, -5 の細胞培養に伴う発現変化について検討したところ, EDG-1 及び EDG-5 の発現は変化しなかったが, EDG-3 の発現が細胞培養時間の増加に伴い有意に増加した. また ASMC において観察された SOC を介した $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は S1P の投与により抑制された. さらに S1P や LPA はラット大動脈のリング標本において, 収縮作用を示さなかった. 【考察】以上のことから脂質メディエーターである S1P や LPA は ASMC に対して多様な効果を示すと考えられる. またその受容体と考えられる EDG の一部は, 血管平滑筋の形質変化により発現変化する可能性が高い.

P-6. ノルアドレナリンの気管平滑筋弛緩作用に 2 種類の β_1 -アドレナリン受容体が関与する可能性について

東邦大学薬学部薬理学

田中 芳夫, 堀之内孝広, 小池 勝夫

【目的】気道平滑筋には, β_2 -アドレナリン受容体 (β_2 -AR) が高密度に発現しており, その緊張性制御に重要な役割を果たしている. しかし, 内因性カテコラミン (noradrenaline, NA; adrenaline, AD), 特に, NA の弛緩作用に関与する β -AR のサブタイプに関しては, いまだに不明の点が多い. 本研究では, 各種 β -AR 拮抗薬を用いて, NA の弛緩作用に関与する β -AR サブタイプの薬理学的同定を行った. 【方法】雌雄モルモットの摘出気管標本を histamine にて収縮させ, NA の濃度反応曲線に対する各種 β -AR 拮抗薬 [propranolol: β_1/β_2 非選択的拮抗薬; bupranolol: $\beta_1/\beta_2/\beta_3$ 拮抗薬; atenolol, CGP-20,712A: β_1 選択的拮抗薬; butoxamine, ICI-118,551: β_2 選択的拮抗薬] の影響を解析した. 【結果】(1) α -受容体拮抗薬・取り込み阻害薬非存在下においては, propranolol・bupranolol・butoxamine・ICI-118,551 の NA に対する pA_2 値(それぞれ, 7.5, 7.6, 4.8, 6.4) は, salbutamol に対する値(それぞれ, 8.7, 8.9, 6.9, 8.8) よりも有意に小さな値を示し, 10^{-pA_2} の比は, 20~300 であった. (2) α -受容体拮抗薬 (phentolamine) 存在下においては, ICI-118,551 の pA_2 値 (6.9) は, phentolamine 非存在下で算出された値よりも 3 倍大きな値となった. (3) Phentolamine, 取り込み阻害薬 (desipramine, deoxycorticosterone) 存在下においては, ICI-118,551 の pA_2 値は, 取り込み阻害薬非存在下において算出された値と一致した. 一方, propranolol・atenolol は, NA の濃度反応曲線を 2 相性に抑制し, それぞれ, 8.6 と 8.3 (propranolol), 7.0 と 6.5 (atenolol) 付近の 2 つの pA_2 値を持ち合わせる事が示された. 【考察】NA の気管平滑筋弛緩作用には, β -AR 拮抗薬に高親和性ならびに低親和性を有する 2 種類の β_1 -AR (β_1 AR_{(high)}, β_1 -AR_{(low)}) が関与することが示された.}}

P-7. ヒト膀胱平滑筋におけるムスカリン受容体サブタイプの役割：正常膀胱と過活動膀胱との比較

獨協医科大学泌尿器科

山西 友典, 水野 智弥, 中西 公司, 阿部 英行, 釜井 隆男

【目的】ヒト膀胱平滑筋には M_2 ムスカリン受容体が多く分布しているが、その収縮は主に M_3 受容体に関与していると報告されている。しかし実験的に脊髄を損傷したり、骨盤神経を切除したラットでは、 M_2 の up-regulation がおこり、その収縮は M_2 が主に関与したものであったとも報告されている。今回ヒト膀胱体部の平滑筋収縮におけるムスカリン受容体のサブタイプの役割につき、正常膀胱と過活動膀胱とで比較検討した。【方法】下部尿路症状を認めない症例における膀胱全摘出術時（正常膀胱）、または神経因性膀胱で膀胱拡大術あるいは前立腺肥大症で前立腺被膜下摘出術を行った症例のうち過活動膀胱症状を有し、尿流動態検査で排尿筋過活動が認められた症例（DO）における膀胱平滑筋切片を摘出した。組織切片から粘膜、漿膜を摘除し、Krebs 液 5 ml の入った organ bath に吊るし、1 g の静止時張力で 1 時間固定した後、carbachol (CA) の濃度—収縮曲線 (CRC) を作成した。次に種々のムスカリン受容体拮抗薬 (4-DAMP, methoctramine, pirenzepine, tolterodine, propiverine, oxybutynin, trospium) の親和性 (pA_2 値) を測定した。【結果】正常膀胱におけるムスカリン拮抗薬は、CA の CRC を競合的に拮抗し、その親和性は、 M_3 受容体に一致した。過活動膀胱症例においてもムスカリン拮抗薬の親和性は変わらなかった。【結論】ヒト膀胱平滑筋における収縮は、正常膀胱、過活動膀胱ともに、主に M_3 受容体に関与していると考えられた。

P-8. ヒト膀胱平滑筋における電位依存性 L 型 Ca^{2+} 電流に及ぼす頻尿治療薬塩酸フラボキサートの効果

九州大学大学院医学研究院泌尿器科学¹, 九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学², 九州大学大学院医学研究院病理病態学³

友田 稔久^{1,2}, 寺本 憲功², 相島真奈美^{1,2}, 高野 徳昭¹, 中野 敏明³, 米満 吉和³, 居石 克夫³, 関 成人¹, 内藤 誠二¹, 伊東 祐之²

【目的】塩酸フラボキサート（以下フラボキサート）はこれまで頻尿治療薬として広く泌尿器科領域で用いられてきた。その作用機序としてフラボキサートは主に中枢神経の排尿中枢に作用し排尿機序を制御すると考えられてきた。しかし一方でフラボキサートは、排尿平滑筋そのものに効果を及ぼし弛緩作用を引き起こすという報告もあるが、未だその詳細な弛緩機序や標的となるイオンチャネル等に関する報告はほとんどない。そこで我々はヒト膀胱平滑筋 L 型 Ca^{2+} チャネルに対するフラボキサートの効果について検討した。【方法】ヒト膀胱平滑筋を用いた等尺張力測定法と L 型 Ca^{2+} 電流に対する効果をパッチクランプ法を適用して観察した。【結果】高濃度カリウム液投与により惹起された膀胱平滑筋の筋収縮に対してフラボキサートは濃度依存的、可逆的弛緩作用を示した。また電位依存性内向き Ba^{2+} 電流の最大振幅値は、フラボキサート投与により濃度依存的かつ電位依存的に抑制された。保持電位を -90 mV とした時フラボキサートは電位依存性 Ba^{2+} 電流の steady-state inactivation 曲線を左方移動させた。免疫化学組織学的染色手法によりヒト L 型 Ca^{2+} チャネルのチャネルポアの構成成分である α_{1c} subunit 蛋白が存在することが明らかとなった。【結論】フラボキサートはヒト膀胱平滑筋の L 型 Ca^{2+} チャネルを直接抑制し排尿筋の弛緩作用をもたらす可能性が示唆された。

P-9. 低酸素による肺胞上皮細胞カリウムチャンネル発現調節と電流変化

東北大学大学院医学系研究科分子薬理学¹, 東北大学大学院歯学研究科歯科口腔麻酔学²

今野 俊宏¹, 小川 和宏¹, 増宮 晴子¹, 高橋 雅彦², 柳澤 輝行¹

【緒論】肺胞上皮細胞はガス交換に主に関わる1型細胞と、サーファクタント分泌および肺胞腔の水分輸送に関わる2型細胞で構成されている。肺水腫やCOPDは、肺胞上皮細胞が低酸素状態におかれる疾患である。肺胞上皮2型細胞が、低酸素状態で水分輸送に関わるイオン輸送に障害を受けるという報告がある。そこで我々は、低酸素状態でのイオン輸送と細胞容積の調節に、どのようなカリウムチャンネルが関わるかを検討した。【方法】肺胞上皮2型細胞由来の癌細胞であるA549細胞を用いて24~72時間の低酸素曝露(H)を行った。この条件下で培養した細胞を用いて、パッチクランプ法によるイオン電流の測定と、RT-PCR法によるカリウムチャンネル群の遺伝子発現変化の解析を行った。【結果】RT-PCR法の結果、H24時間で $K_{V1.2}$ 、 $K_{V1.5}$ のmRNA levelが大きく上昇した。一方、それより遅れて発現量が上昇したものは、 $K_{V2.1}$ 、 $K_{V3.3}$ 、 $K_{V9.3}$ 、KCNQ1、HERG、BK、TWIK-1、TWIK-2、TREK-1であった。また、TASK-2については、H24時間で発現量が減少するという結果を得た。パッチクランプ法により、外向きカリウム電流がH48時間以降で増加することが観察された。ナトリウム電流やカルシウム電流は観察されなかったが、容積感受性のクロライド電流が低酸素下で維持されていた。【結論】今回我々はH48時間で、A549細胞においてカリウムチャンネル群の発現量増加を伴って、外向きカリウム電流が増加するという結果を得た。また、H24時間では、電流増加を伴わずに発現増加のみられるチャンネルや、発現量が減少するものもあった。これらの現象は各々、急性・亜急性の低酸素状態におけるイオン輸送の変化に関わっている可能性がある。今回我々が観察した現象は、急性から亜急性の低酸素状態に関連した呼吸器疾患の病態機序への関わりが考えられる。

P-10. ヒト子宮平滑筋で発現変化する4種のT型 $Ca_v3.2$ チャンネル $Ca_v3.2$ のスプライスアイソフォームについて

福岡歯科大学歯学部細胞分子生物学¹, 福岡大学医学部産婦人科学²

大久保つや子¹, 井上 善仁², 瓦林達比古², 北村 憲司¹

【目的】T型電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $Ca_v3.2$ のIII-IVリンカー領域に存在するexon25Bとexon26の選択的スプライシングにより生じる4種のアイソフォーム、 $\Delta 25B/\Delta 26$ 、 $\Delta 25B/+26$ ($\alpha 1Ha$; native form)、 $+25B/\Delta 26$ 、 $+25B/+26$ のクローニング及び電流特性の比較検討を行い、分子構造の変化が及ぼすチャンネル特性への影響を検討した。またヒト子宮平滑筋における発現を検討した。【方法】ヒト子宮筋組織より得たcDNAを鋳型に $Ca_v3.2$ の塩基配列(Genbank: AF073931)PCRクローニングを行った。これを鋳型にcRNAを合成してアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、二電極膜電位固定法にて Ba^{2+} 電流(10mM Ba^{2+} 溶液を用いた)を測定した。また、これらアイソフォームの半定量的PCR解析を行った。【成績】exon25Bによるアミノ酸配列は、電位依存性の活性化及び不活性化の電位を過分極側に移動させた。また、活性化と不活性化の速度を速くした。これらの電流特性にはexon25Bのアミノ酸配列中の疎水性の高い領域が関与することが示唆された。exon26単独では上記の電流特性に殆ど影響しなかった。exon25Bとexon26の組み合わせで正電荷を獲得すると、不活性化過程からの回復が早くなった。妊娠によって、子宮筋組織におけるこれらアイソフォームの発現量が変化した。【結論】以上のことから、 $Ca_v3.2$ のIII-IVリンカー領域の分子構造の変化がチャンネルの活性化、不活性化に影響を与えることが示唆された。またヒト子宮平滑筋においてT型電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが何らかの生理的機能を担う可能性が示唆された。

P-11. モルモット胃輪状平滑筋におけるサイクリックヌクレオチド活性化による電位依存性 Ba²⁺ 電流に対する修飾機序に関する検討

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理学¹, オーストラリア国立大学ジョン=カーティン医学研究所神経科学部門²

朱 海雷¹, 寺本 憲功¹, デービット ハースト², 伊東 祐¹

【目的】 β アドレナリン受容体を介した cAMP 産生に伴う PKA 経路 (cAMP/PKA 経路) の活性化と神経終末から放出される NO によって活性化される cGMP/PKG 経路は平滑筋弛緩反応の重要なセカンドメッセンジャー機序である。そこで我々はモルモット胃平滑筋において両サイクリックヌクレオチド依存性経路を活性化することが電位依存性 Ba²⁺ 電流 (Ba²⁺ 電流) に対してどのような効果をもたらすかを検討した。【方法】モルモット胃平滑筋単離細胞にパッチクランプ法を適用した。【結果】膜透過型 cAMP である dibutyl cAMP (db-cAMP) は Ba²⁺ 電流の最大振幅値を濃度依存的に抑制し forskolin や isoproterenol も同様に Ba²⁺ 電流の最大振幅値を濃度依存的に抑制した。しかし Rp-cAMP や PKA inhibitor peptide 5-24 存在下では db-cAMP や forskolin は Ba²⁺ 電流は抑制されなかった。一方, sodium nitroprusside や膜透過型 cGMP の 8-Br-cGMP は Ba²⁺ 電流は濃度依存的に抑制された。db-cAMP 前投与により Ba²⁺ 電流を抑制した後 8-Br-cGMP を追加投与してもさらなる抑制は観察されなかった。また PKG inhibitor 存在下に db-cAMP や forskolin を投与しても Ba²⁺ 電流抑制の程度は PKG inhibitor 非存在下の時と比し有為差はなかった。同様に PKA-IP 存在下で 8-Br-cGMP を投与しても Ba²⁺ 電流抑制の程度は PKA-IP 非存在下の時と比較して有為差はなかった。【結論】モルモット胃輪状平滑筋の電位依存性 Ca²⁺ チャネルに対して cAMP/PKA 経路と cGMP/PKG 経路は非依存的に抑制すると考えられた。

P-12. ヒト摘出胃粘膜筋板の自律神経支配の薬理学的特徴

— 外層の縦走および輪走平滑筋との比較 —

獨協医科大学医学部薬理学¹, 獨協医科大学医学部第 1 外科², 国立医薬品食品衛生研究所薬理部³

内田 幸介¹, 渋川 朝子¹, 児嶋 修一¹, 佐々木欣郎², 宮地 和人², 砂川 正勝², 大野 泰雄³, 上川雄一郎¹

【目的】消化管粘膜筋板の生理的役割は未だ十分に解明されてはいない。特に、ヒト消化管の粘膜筋板についての研究報告は極めて少ない。今回、われわれは外科手術標本から得られたヒトの胃粘膜筋板を用い、その自律神経支配について検討し、外層の縦走、輪走平滑筋と比較した。【方法】外科標本より得られた切片を、粘膜側と外層の平滑筋層とに分割した。粘膜側を粘膜筋板標本、外層の平滑筋層を縦走あるいは輪走筋標本として、オルガンバス内に懸垂した。それぞれの標本でのフィールド刺激 (FS: 0.3 ms duration, 1-64 Hz and 20-30V for 10s) による反応を導出し、その反応への各種拮抗薬の影響を検討した。【成績】胃粘膜筋板では、一般に FS によって頻度依存性の速やかな弛緩反応が得られた。この速い弛緩反応は、テトロドトキシン (0.3-1 μ M) や L-NAME (300 μ M) にて消失し、むしろ収縮へと反転した。この L-NAME 処置でみられた収縮反応はアトロピン (1 μ M) によってわずかに抑制された。また、一部の胃粘膜筋板標本では、低頻度刺激 (1-8 Hz) で緩やかな弛緩反応を認めた。この緩やかな弛緩反応はプロプラノロール (5 μ M) にて消失した。外層の縦走、輪走筋標本では、FS によって頻度依存性の速い収縮反応が認められた。この速い収縮反応はアトロピン (1 μ M) によって著明に抑制された。さらに、自発性張力の高い標本やアトロピン存在下の標本などでは、頻度依存性の弛緩反応が観察された。この弛緩反応は L-NAME (300 μ M) にて消失した。【結論】ヒト摘出胃粘膜筋板では、抑制性の NO 神経支配を強く受けており、抑制性のアドレナリン性神経支配や興奮性のコリン性神経支配は弱いものと考えられる。それに比して、外層の縦走、輪走平滑筋は、主に興奮性のコリン性神経支配と抑制性の NO 神経支配を受けていると考えられる。

P-13. モルモットの排便反射に対する直腸吻合術の影響

奈良県立医科大学消化器・総合外科¹, 奈良県立医科大学第二生理学²

勝井 鍊太^{1,2}, 児島 祐^{1,2}, 中川 正², 藤井 久男¹, 中島 祥介¹, 高木 都²

【目的】直腸手術後の排便機能障害の原因として、吻合部狭窄や直腸貯留能の低下、リンパ節郭清に伴う外来性自律神経切離などが挙げられるが、腸管切離に伴う壁内神経系の遮断もその原因の一つと考えられる。そこで今回、モルモット直腸吻合モデルを作製し、手術操作による神経損傷が排便反射におよぼす影響、およびその経時的变化について検討した。【方法】対象：体重 350-450 g の雄性 SPF モルモット。手術：ネンブタール全身麻酔下に開腹、壁内神経線維が切離されたモデルを作製すべく結腸神経を温存し、肛門縁より 3 cm の直腸を切離した後、7-0 polypropylene suture 18 針にて一層全層単結節縫合を行った。排便反射（直腸-直腸収縮反射および直腸-内肛門括約筋弛緩反射）の測定：ウレタン全身麻酔下に筋弛緩薬で非動化し、肛門管に strain gauge force transducer を装着した後、肛門縁より 5 cm 口側の直腸を加圧伸展させ、直腸の内圧変化および内肛門括約筋の張力変化を術後 1 週目から 4 週目まで計測した。両反射の定量的評価方法として直腸-直腸反射には area under the curve (AUC)、直腸-内肛門括約筋反射には area over the curve (AOC) を用い、AUC、AOC の比を reflex index として非手術例のコントロール群と比較検討した。【結果】直腸/直腸反射はいずれの期間においても認められ、コントロール群と有意差は認めなかった。一方、直腸-内肛門括約筋反射はいずれの期間においてもコントロール群に比べて有意に低値であったが ($P < 0.01$)、術後 1 週に比べ術後 3 週目 ($P < 0.05$) および 4 週目 ($P < 0.01$) では有意に増大した。【結語】術後経過に伴う排便反射の経時的な回復が認められ、壁内神経系の再生が示唆された。さらに、直腸切除吻合モデルでの検討および免疫組織学的検討の結果も合わせて報告する。

P-14. W/W^v マウスの摘出小腸では蠕動は起こらない

奈良県立医科大学医学部生理学第二¹, 奈良県立医科大学医学部消化器総合外科²

中川 正¹, 三澤 裕美¹, 藤井 久男², 中島 祥介², 高木 都¹

【目的】壁内神経系 (enteric nervous system: ENS) が蠕動運動に欠かせないものであり、振子運動や分節運動などの自動運動の発生にはカハールの介在細胞 (interstitial cells of Cajal: ICC) が重要な役割を担っていることはよく知られている。しかし ICC の働きが蠕動運動の発生に不可欠かどうかについては議論の余地がある。蠕動運動における ICC と ENS の役割を明らかにすることをこの研究の目的とした。【方法】雄マウス (WBB6F1- W/W^v と +/+) から長さ 4 cm の回腸を摘出し、50 ml の Tyrode 液 (37°C) を満たした灌流槽内で実験を行った。縦走筋方向の収縮は isometric force transducer、輪走筋方向の収縮は pressure transducer を介して記録した。ビデオ撮影も行いこれを解析した。【結果】腸管内腔圧 0~0.5 cmH₂O で自動運動を比較した。+/+ マウスでは口側端から肛側端に向かって伝播する強い蠕動が認められた。L-NAME の投与によりその出現頻度と伝播性が増加したが、TTX の投与により蠕動は消失した。W/W^v マウスでは不規則な自動運動が観察されたが、蠕動は認められなかった。L-NAME の投与によりその自動運動の出現頻度と振幅が増加した。TTX の投与によりこれらの運動の振幅が減少することがあったが消失しなかった。【結論】少なくともマウスの回腸においては、蠕動の発生に ICC と ENS の両方が不可欠であると考えられる。

P-15. 平滑筋細胞からの bradykinin による ATP 放出への ABC トランスポーターの関与の可能性

福岡大学医学部薬理学¹, 福岡大学医学部病態機能系総合²

桂木 猛¹, 趙 玉梅¹, 佐藤千江美¹, 薄根 貞治², 右田 啓介¹

培養結腸紐平滑筋細胞の灌流実験から bradykinin (0.1-1.0 μ M) は ATP の細胞外への放出を引き起こし, これは B₁ でなく B₂-受容体遮断薬 (HOE140) で拮抗された. さらにこの ATP 放出は U-73122 (phospholipase C 阻害薬), thapsigargin (Ca²⁺-ATPase 阻害薬), W-7 (Ca²⁺/Calmodulin 阻害薬) および BAPTA/AM (細胞内 Ca²⁺ キレーター) によって抑制された. また, これは hemichannel 遮断薬の gap26 や α -glycyrrhetic acid, CFTR と関連する Cl⁻ channel 遮断薬の glybemclamide, Gd³⁺, NPPB では拮抗されず, MRP 阻害薬の MK-571, benzbromarone によって拮抗された. しかし, cyclosporine A や probenecid, verapamil などは無効であった. その他, この ATP 放出は, cytochalasin D, staurosporin, niflumic acid, NEM により抑制されたが, ゴルジ体からの小胞輸送を阻害する brefeldin A やミトコンドリア阻害薬の rotenone や oligomycin では抑制されなかった. 以上のことより, bradykinin による ATP 放出には, 先ず小胞体からの ATP 遊離とこれに続く膜の ABC トランスポーター, 特に多剤耐性トランスポーターを介した細胞外への輸送機構の存在が示唆された.

P-16. オキシトシンのマウス子宮平滑筋一過性・持続性収縮機構の解析

東北大学医学研究科分子薬理学¹, 東北大学農学研究科分子生物学², 大阪府立成人病センター婦人科³

川又 理樹^{1,2}, 殿村 優², 木村 正³, 柳澤 輝行¹, 西森 克彦²

オキシトシン (OT) 子宮平滑筋を収縮させるホルモンであるが, 特に分娩時にはその受容体 (OTR) の発現が劇的に上昇し, 感受性や収縮力が上がると言われている. しかし, マウス子宮平滑筋を用いた場合, 非妊娠発情期と妊娠期ではこれらに顕著な差は認められず (1), 唯一の相違点は発情期では一過性の収縮が主で持続性収縮は非常に小さいのに対し, 妊娠期では主に持続性収縮が発生していることである. 一方, 発情休止期では持続性収縮同様, 一過性収縮もほとんど生じなかった (2). そこで我々は持続性収縮のみの濃度反応曲線も作製して両者定量的に調べ, さらにそれらの発生機構, 特に妊娠期で持続性の収縮力が増大する仕組みについて調べた. 発情期・妊娠期で発生する一過性の収縮は低濃度の OT に対しても大きな収縮を示し, 濃度反応曲線における slope 値は非常に高く, pD₂ 値は発情期で 9.44, 妊娠期で 9.06 であった. これに対し, 持続性収縮は最大収縮力にのみ顕著な差が見られ (発情期 30.0%, 妊娠期 176.4%), 発情期での slope 値は 1.60, pD₂ 値は 8.20, 妊娠期での slope 値は 1.55, pD₂ 値は 8.46 で発情期と同様の値を示した. 以上の結果から一過性収縮と持続性収縮とでは最大収縮力, slope 値, pD₂ 値において大きな違いがあることが明らかとなった. 次にこの一過性収縮と持続性収縮の発生する機構を 0 Ca²⁺ 条件下や verapamil, Y-27632, CPA の各種阻害剤を用いて調べたところ, 両収縮は細胞外の Ca²⁺ 流入により生じ, その収縮力は Rho signal によって増加することが示された. また一過性収縮は L-型 Ca²⁺ channel, 持続性収縮は L-型 Ca²⁺ channel と store-operated Ca²⁺ channel (SOC) からの Ca²⁺ 流入により生じ, 発情期に比べ妊娠期で大きな持続性収縮が引き起こされる原因の一つは SOC による収縮が妊娠期で非常に大きいためである事が示された. (1) Kawamata et al. 2003 EJP 472, 229-234 (2) Kawamata et al. 2004 BBRC 321, 695-699

P-17. Th1/2 サイトカインによる気道平滑筋の収縮能の変化

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

太田 良紀, 大池 正宏, 伊東 祐之

気管支喘息の主要な病態は気道の炎症と過敏性であると考えられている。サイトカインバランスの異常, すなわち Th2 サイトカインの過剰が気管支喘息の発症原因のひとつとされるが, Th2 サイトカインと気道過敏性形成との因果関係は十分には解明されていない。我々は Th2 サイトカインのインターロイキン 4 (IL-4) と 13 (IL-13), 及び Th1 サイトカインのインターフェロン γ (IFN- γ) がウシ気管平滑筋細胞 (BTSMC) の収縮能に与える影響を検討した。BTSMC 包埋コラーゲンゲルを IL/4 で前処置すると ATP 及び A23187 によるゲル収縮が有意に抑制された。一方, IL-13 で処理するとゲルの収縮は著明に増大した。これらの効果はサイトカイン投与 1 時間後から認められ, 3 日後にも残存していた。これに対し, IFN- γ は BTSMC の収縮に影響を与えなかった。PI3 キナーゼ阻害薬の wortmannin と LY 294002 で処理すると, 対照ゲルの収縮には影響がなかったが, IL-4 による収縮低下と IL-13 による収縮増強の両者とも有意に抑制された。一方, これらのサイトカインは何れも ATP や A23187 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇には影響を与えなかった。また, 平滑筋の収縮能は Rho キナーゼによって増強をうけることが知られているが, Rho キナーゼ阻害薬 Y27632 によっても IL-4 と IL-13 の作用は阻害されず, また RhoA 活性化の指標としての RhoA の細胞膜移行もサイトカインによって影響を受けなかった。以上の結果より, IL-4 と IL-13 は BTSMC の収縮能に影響を与え, これは PI3 キナーゼの活性化によるもので, RhoA/Rho キナーゼの活性化や Ca^{2+} 動態の変化は関与しないことが明らかになった。

P-18. ヒスタミン H_3 受容体に結合する細胞内分子の同定

東北大学大学院医学系研究科分子薬理学¹, 東北大学大学院医学系研究科機能薬理学²

助川 淳¹, 倉増 敦朗², 谷内 一彦², 柳澤 輝行¹

消化管や気管支など体内の主要臓器に存在する平滑筋は, 多くの神経伝達物質による複雑な自律神経支配を受けており, その異常は消化管運動障害や喘息などを始めとする種々の病態の原因となっている。また, この平滑筋の収縮や弛緩を制御する神経伝達物質の放出は, シナプス前膜に存在する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の活性によって抑制的に調節されている。シナプス前 GPCR 刺激による神経伝達物質放出抑制には, シナプス前膜に存在する Ca^{2+} チャネルの抑制が関与するとされているが, 異論もあり詳細は明らかにされていない。我々は, 代表的なシナプス前 GPCR であるヒスタミン H_3 受容体による神経伝達物質放出抑制機序を分子レベルで明らかにするために, H_3 受容体と相互作用する細胞内タンパク質を酵母 Two Hybrid 法, また, 質量分析法を用いてスクリーニングした。Two Hybrid 法によるスクリーニングの結果, H_3 受容体カルボキシ末端細胞質内ドメインと相互作用するタンパク質として, 神経細胞のシナプス小胞膜上に存在するとされる細胞内クロライドチャネル分子を同定した。イン・ピトロの結合実験から, この分子が直接 H_3 受容体カルボキシ末端と相互作用することが明らかになった。さらに, ラット脳組織抽出液を用いた免疫沈降実験の結果から, このクロライドチャネル分子が H_3 受容体と脳組織中でも相互作用していることが示唆された。また, H_3 受容体カルボキシ末端ドメインと相互作用するタンパク質をラット脳抽出液からアフィニティ精製し, MALDI-TOF 質量分析法によって解析した結果, シンタキシン結合タンパク質として知られる Munc-18 や, シナプトタグミン, CaMKII α 鎖など, 神経伝達物質放出に直接関わる一連のタンパク質が同定された。現在, これらのタンパク質の相互作用が H_3 受容体の活性発現に果たす役割を検討中である。