

SL-1. The enteric nervous system : Inflammation-induced changes in neuronal function and related changes in motility

¹Department of Anatomy and Neurobiology, The University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vermont, USA

²Department of Physiology and Biophysics, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada

Gary M. Mawe^{1,2}, Derek S. Strong¹, Eric M. Krauter¹ and Keith A. Sharkey^{1,2}

Functional abnormalities in the colon that accompany inflammatory bowel disease likely involve changes in the physiological properties of enteric neurons. We have recently used the trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) model of colitis to investigate the effects of inflammation on enteric neural circuitry in the guinea pig distal colon. TNBS inflammation is associated with changes in a number of physiological properties of myenteric neurons and with a decrease in the rate of propulsive motility in the guinea pig distal colon. Electrophysiological studies of the myenteric plexus of TNBS-inflamed animals have demonstrated that AH (sensory) neurons are hyperexcitable and have an attenuated afterhyperpolarization (J. Physiol. 547 : 589-601, 2003). The afterhyperpolarization of AH neurons is initiated by an intermediate conductance, Ca²⁺-activated K⁺ (IK) current (blocked by TRAM34) and terminated by a hyperpolarization-activated IH current (blocked by ZD7288). An increase in this IH conductance appears to be largely responsible for the attenuated afterhyperpolarization and increased excitability in colitis. Since we have also noted that propulsive motility is disrupted in the inflamed colon, we reasoned that if hyperexcitability of AH neurons is a factor in this disruption, then TRAM34 should reduce motility in normal colon, while ZD7288 should restore motility in inflamed colon. In unpublished studies, we have found that in the normal colon, the IK blocker TRAM34 significantly reduces the fecal velocity, whereas the IH blocker ZD7288 increased velocity. In inflamed tissue, ZD7288 did not alter propulsive velocity in non-ulcerated regions, but appeared to facilitate movement of fecal pellets through ulcerated sites. Inhibition of COX-2 restores the electrical properties of AH neurons to normal parameters, and restores propulsive motility (J. Physiol. 557 : 191-205, 2004).

Inflammation is also associated with a facilitation of synaptic potentials in S neurons of the myenteric plexus, which serve as interneurons and motor neurons. Recent studies have demonstrated that inflammation-induced synaptic facilitation involves a presynaptic mechanism with an increase in protein kinase A activity and an increase in the readily releasable pool of synaptic vesicles (J. Physiol. 581 : 787-800, 2007).

An issue that is relevant to irritable bowel syndrome and altered gut function during remission from inflammatory bowel disease is whether inflammation-induced neuroplastic changes persist beyond the recovery from inflammation. Recently, we have found that the inflammation-induced decrease in propulsive motility, hyperexcitability of AH neurons and synaptic facilitation persist at least 4 weeks beyond the recovery from inflammation. Furthermore, COX-2 inhibition at a post-inflammatory time point does not restore motility.

In summary, a number of critical elements of enteric neural signaling are affected by inflammation. These include sensory neuron excitability and synaptic communication. Altered neural signaling appears to have a deleterious effect on colonic motility that persists beyond recovery from inflammation.

SL-2. The Role of Hydrogen Peroxide in Myocardial Metabolic Dilation

Professor and Chairman, Department of Physiology and Pharmacology
Northeastern Ohio Universities College of Medicine
Rootstown, Ohio, USA

William M. Chilian

The coupling of blood flow to metabolism is the most important vasomotor adjustment for the regulation of oxygen delivery to metabolically active organ systems. This matching, termed metabolic dilation, or metabolic or active hyperemia, is critical to ensure adequate oxygen delivery for aerobic metabolism and adequate organ function. Although the factor or factors responsible for the coupling of flow to metabolism have been actively pursued for decades, no metabolite has been causally linked to the process of metabolic hyperemia or has withstood critical evaluation. Most investigations have pursued the idea that the metabolic regulation of flow is a negative feedback pathway, in which an imbalance between oxygen supply (delivered via flow) and oxygen demands, i.e., demands exceed supply, results in the production of a metabolic dilator. The adenosine hypothesis was such a scheme, in which oxygen demands, in excess of supply would increase the production of adenosine through hydrolysis of ATP and subsequent dephosphorylation of ADP and AMP. However, the adenosine hypothesis has been largely refuted for normal metabolic dilation. Accordingly, our hypothesis centered on a different scheme in which the production of a metabolic dilator would be a feed-forward system—one without an error signal—that would be directly linked to oxygen consumption. We hypothesized that H_2O_2 would link oxygen consumption and blood flow. Our hypothesis was based on observations showing that H_2O_2 is vasoactive, has a short half-life, because it is metabolized rapidly by catalase, rapidly oxidizes free thiol groups, and is freely permeable—all requirements of a metabolic dilator. Accordingly, we tested the hypothesis that H_2O , the dismutated product of O_2^- , couples myocardial oxygen consumption to coronary blood flow. To test this hypothesis, we measured O_2^- and H_2O_2 production by isolated cardiac myocytes, determined the role of mitochondrial electron transport in the production of these species, and determined the vasoactive properties of the produced H_2O_2 . The production of O_2^- is coupled to oxidative metabolism because inhibition of complex I (rotenone) or III (antimycin) enhanced the production of O_2^- during pacing by about 50% and 400%, respectively; whereas uncoupling oxidative phosphorylation by decreasing the protonmotive force with carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenyl-hydrazine (FCCP) decreased pacing-induced O_2^- production. The inhibitor of cytosolic NAD(P)H oxidase assembly, apocynin, did not affect O_2^- production by pacing. Aliquots of buffer from paced myocytes produced vasodilation of isolated arterioles (peak response about 70% of maximal dilation) that was significantly reduced by catalase or the antagonist of Kv channels, 4-aminopyridine. In intact animals, tissue concentrations of H_2O_2 are proportionate to myocardial oxygen consumption and directly correlated to coronary blood flow. Intracoronary infusion of catalase reduced tissue levels of H_2O_2 by 30%, and reduced coronary flow by 26%. Intracoronary administration of 4-aminopyridine also shifted the relationship between myocardial oxygen consumption and coronary blood flow or coronary sinus PO_2 . Because H_2O_2 oxidizes thiol groups, we also determined if vasoactive product(s) of cardiac metabolism would mimic the redox-mediated actions of H_2O_2 in producing vasodilation. Specifically, the dilation produced by cardiac metabolites and by H_2O_2 was similarly blunted by catalase, by the reductant, dithiothreitol, and by the glutathione precursor, N-acetylcysteine, and was sensitive to inhibition of the redox mediated MAP Kinase, p38. We also found the H_2O_2 oxidized thiol residues in Kv channels to produce channel opening and thus, hyperpolarization and vasodilation. Taken together, our results demonstrate that O_2^- is produced in proportion to cardiac metabolism, which leads to the production of the vasoactive reactive oxygen species, H_2O_2 . Our results further suggest that the production of H_2O_2 in proportion to metabolism couples coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. The dilator actions of H_2O_2 are redox mediated and act by oxidizing thiol residues in Kv channels to produce hyperpolarization and thus smooth muscle relaxation.

EL. 平滑筋興奮の多様性と興奮収縮連関

名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野

今泉 祐治

平滑筋の性質は臓器ごとに大きく異なる（多様性）ため生理学的に体系づけて語れず、headache muscle と呼ばれてきたという講義を30程年前に受けた記憶がある。その当時、平滑筋細胞の構造、自律神経終末と平滑筋の関係から平滑筋臓器ごとの自律神経支配の密度、平滑筋間の電氣的つながりや活動電位・歩調取り電位・シナプス後電位の違いが次々に明らかとなっていた時代で、すぐにもその多様性の基盤が解明されていく期待があった。特に平滑筋の収縮蛋白に関する研究は大きく進展して、ミオシン軽鎖キナーゼとカルシウム-カルモジュリンによるミオシンリン酸化説が明らかとなることで、少なくとも収縮に関しては横紋筋と異なる機構が確立されてきた。しかし興奮性の観点からはその後も多様性を克服できず臓器別の記述が続き、現在でも活動電位・筋細胞膜・横行小管・筋小胞体・収縮関連蛋白などの興奮収縮連関を支える機構が明確に確立している骨格筋・心筋に比べ、平滑筋の興奮性が一概に語れず曖昧模糊としている印象があるかもしれない。

ここでは細胞レベルで平滑筋の興奮性が大きく異なる原因が何かという疑問について述べたい。便宜上、精管・膀胱・門脈・細動脈など生理的に活動電位を発生して収縮する平滑筋（高興奮性群）と全く発生しない大径の動脈や気管などの平滑筋（低興奮性群）に分類する。主にラットの各種臓器平滑筋細胞で発現しているイオンチャネルの種類と密度を検討すると、当然のことながら高興奮性群においてL型Caチャネル($\alpha 1C$)の発現が高い。しかし例えば大動脈と精管の比較で蛋白レベルおよび電流密度は5倍強程度の違いで、興奮性の差の説明には十分でない。K電流のうち最大の成分は多くの平滑筋において大コンダクタンスCa活性化K(BK)チャネルであり、蛋白発現量は同等程度であるものの、電流密度としては細胞内Ca濃度上昇の程度に比例して数倍の差がある。電位依存性KチャネルのうちKv2.1は広汎に発現しているものの、Kv1.2やKv1.5が特に低興奮性群で高発現していること、早期不活性型Kv4.3が高興奮性群で高発現していることなどが特徴的である。すなわち興奮性は基本的にはL型Caチャネル発現密度に依存しているものの、低興奮性群におけるBKチャネルおよびKv1.2や1.5の発現の高さも低興奮性に大きく寄与している。このことは4-aminopyridineやtetraethylammoniumなどでKvチャネルを抑制すると自発性活動電位が低興奮性群でも生じることで裏付けられる。個別の平滑筋で他のKチャネルの静止膜電位維持への寄与などについて、多くの報告があるが興奮性との関連で普遍性は明らかでない。また発生学的な平滑筋興奮性の由来とこれらのチャネル機能発現調節との関係については全く解明されていない。

心筋で細胞内局所の筋小胞体からのリアノジン受容体Ca遊離チャネル(RyR)を介した自発性Ca遊離(Caスパーク)が興奮収縮連関時の単位Ca動態として解明された。平滑筋でも興奮性には依存せず広汎にCaスパークが観察された。平滑筋でのCaスパークの生理的意義のひとつは、近傍細胞膜上のBKチャネルを活性化させ自発性一過性外向き電流(STOCs)を発生させ、静止膜電位維持に一部寄与することである。特に低興奮性群では主な機能であることはBKチャネルやRyRの遺伝子改変マウスを用いた研究で十分に明らかになってきた。一方、高興奮性群において、Caスパークが心筋と同様、興奮収縮連関に重要であるかどうかについてはいまだに議論があるものの、単一活動電位での興奮収縮連関にRyRが極めて重要であることは膀胱・精管細胞で示された。また横行小管はないものの、カベオラと筋小胞体の連関が示唆されるなど、高興奮性群での興奮収縮連関機構が明らかになってきた。平滑筋興奮性の多様性と興奮収縮連関が少なくとも一部は体系的に語れるようになったと思われる。

シンポジウム 1 ユビキタスペースメーカ

S-1. 全身のペースメーカ Ca^{2+} オシレーション

名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学¹, 京都大学大学院医学研究科脳病態生理学²,
日本大学医学部生理学³

中山 晋介¹, 劉 紅年¹, 後藤 和教², 山下 俊一³

近年の一連の研究によって, Cajal の介在細胞 (Interstitial cells of Cajal: ICC) とよばれる特殊な間質細胞が消化管運動のペースメーカとして働くことが確定的となっている。また一方, 泌尿・生殖器やリンパ管・静脈系などを含めた全身の自律神経系臓器・組織に類似の細胞が存在するとの報告が集まっている。すなわち, これら ICC 及び ICC 類似細胞は, 生体内どこにでも存在する, まさにユビキタスペースメーカという新しい概念で捉えることができる。消化管の ICC では 50 mV にも達する活動電位が記録されている。この巨大なペースメーカ電位を作り出すチャネルの候補として, Ca^{2+} 依存性マキシ Cl^- チャネルや Ca^{2+} 依存性の非選択性陽イオンチャネルが報告されている。これらのチャネルがペースメーカ電位を発生する起電性チャネルであるならば, その根底にあるプライマリペースメーカ機構は周期的な細胞内 Ca^{2+} 活動 (オシレーション) ということになる。私たちは, 消化管 ICC が発生する自発性活動電位は, その細胞内 Ca^{2+} オシレーションと同期することを実証し, さらにこの活動には細胞内 Ca^{2+} 放出チャネルと細胞膜の Ca^{2+} 透過性イオンチャネルが協調作業することが必要であることを見いだした。引き続き, 尿道, 門脈, 膀胱, 腎盂など全身の様々な組織において, ICC 類似間質細胞の自発性 Ca^{2+} 活動の重要性が次々と報告されている。本シンポジウム演題では, これら ICC/ICC 類似細胞の Ca^{2+} 活動特性について総説する。

S-2. モルモット胃各領域における ICC の形態学的特徴

早稲田大学人間科学学術院健康福祉科学科

小室 輝昌, 国沢 裕美

カハールの介在細胞 (Interstitial Cells of Cajal: ICC) は, 消化管筋組織における運動のペースメーカおよび神経信号の伝達装置として働くことが明らかにされているが, その分布や形態学的特徴は消化管の部位によって異なる。本研究では, 同一の器官内でも領域によって ICC の分布に相違を示す胃について, ICC 細胞網の三次元的構築, 神経要素との関係等を知るためモルモット胃について検索した。試料はアセトン固定後, 凍結切片および全載伸展標本とし, Kit 抗体 (ICC), PGP9.5 抗体 (神経要素) による免疫組織化学的染色を施し, 共焦点顕微鏡によって観察した。輪走および縦走筋層内の ICC は部位により相違を示し, 胃底部では単純な双極性の形の細胞が多く, 胃体部より幽門部にかけては一次突起の先端で分枝を示すものが多く観察された。分枝の傾向は, 輪走筋層の内層 (粘膜に近い側) でより多く見られる傾向にあった。筋層内の ICC は輪走縦走両筋層とも, 神経線維と密接して観察されたが, これは, ICC の神経信号の伝達装置としての機能と良く符号する所見であった。また, 幽門括約筋部に近い幽門前庭部の一部には, 輪走筋層と粘膜下結合組織との境界部に ICC-SM が観察された。筋層間神経叢部の ICC-MP は胃底部には存在せず, 胃体部から少数出現し, 幽門前庭部では非常に発達して認められた。全載伸展標本による観察から, この幽門前庭部の ICC-MP は小腸で見られるような神経節を囲む明瞭な籠状構造は作らず, 不規則な束状, 集塊状をなして分布することが明らかとなった。胃では蠕動運動は胃体部から始まり幽門部に伝播することが生理学的実験から知られているが, これらの生理学的知見との関連のもとに上記の観察所見について考察する。

S-3. モルモット胃平滑筋の歩調とり活動の性質について

名古屋市立大学医学部生理学

鈴木 光

モルモット胃平滑筋の各部位から1辺0.5 mm程度の平滑筋組織小片を摘出し、輪走平滑筋から細胞内電極を用いて膜活動を記録すると、噴門部ではほとんど自発活動はないが、体部から幽門部にかけて律動的に発生する緩電位が記録できる。緩電位の頻度は体部で高く(5-6回/分)、幽門部では低い(1-2回/分)ので、活動の律動部は体部にあると思われる。組織化学的にICCの分布を調べると、体部は主にICC-IMが分布し、幽門部にかけてICC-MYが分布していた。いずれの部分にもICC-IMが分布するので、胃における歩調とり活動はICC-IMで創られていると考えたが、幽門部において、輪走筋を除去しICC-MYのみ含有する筋組織でも低い頻度ながら自発活動が観られたので、いずれの型のICCも自発活動を発生し得ることがわかった。活動の頻度はICC-IMの方がICC-MYより速い。薬物反応の差異を検討すると、カフェイン1 mMはICC-IMの活動を抑制するが、ICC-MYの活動はその発生頻度をわずかに低下させるだけであった。NOはICC-IMの活動を強く抑制したが、ICC-MYにはほとんど効果がなかった。アセチルコリンはICC-IMの活動を増強し、単電位の発生頻度を増やし、緩電位の頻度も増加させたが、ICC-MYの活動に対する興奮作用は比較的弱かった。ICC-IMとICC-MYの自発活動の性質の差異について考察する。

S-4. ラット腎盂ペースメーカー領域に対する Glivec (STI 571) の効果

日本大学医学部生体機能医学系生理学分野¹、東京医科大学細胞生理学²、
名古屋大学大学院医学専攻細胞生理学³

山下 俊一¹、國分 眞一郎¹、小西 真人²、中山 晋介³

c-kit 受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるGlivec (STI 571) のラット腎盂ペースメーカー領域に対する効果を8×8多電極アレイおよびマクロズーム顕微鏡による細胞内Ca²⁺濃度測定により解析した。腎杯から尿管までを一塊として摘出した標本を多電極アレイ(1.2×1.2 mm, 電極間150 μm)で走査することにより、電気的興奮の起始部位をとらえることができた。このペースメーカー領域は上部腎盂にあり、生理的状态では電気的活動は毎回同部位から起こり、ほぼ同じ経路で下流に伝播した。一方、ギャップジャンクション阻害剤18β-glycyrrhetic acid, およびheptanol存在下では興奮の頻度と伝播速度は著しく抑制された。この時、興奮は様々な部位より発生し様々な経路で伝播した。標本をfluo-3で染色して蛍光観察することで、このペースメーカー領域の個々の細胞のCa²⁺濃度上昇を捕らえることができた。ペースメーカー領域の構成には2~3個の同期的なCa²⁺濃度上昇を示す細胞が関与するが、多電極アレイによる観察と同様ギャップジャンクション阻害剤存在下では同期性は失われた。多電極アレイによる観察ではniflumic acid, genistein, STI 571はいずれも電気的活動の振幅を抑制したが、STI 571だけが頻度を抑制した。ギャップジャンクション阻害剤存在下に観察される個々の細胞の自発的なCa²⁺濃度上昇はSTI 571により濃度依存性に抑制されたが、非特異的チロシンキナーゼ阻害剤であるgenisteinによっては抑制されなかった。これらの結果から、我々はラット腎盂ペースメーカーは複数個のSTI 571感受性細胞がギャップジャンクションを介して同期的に活動することにより構成すると考えている。

S-5. ES 腸管における組織構築と運動能

奈良県立医科大学医学部分子病理学¹, 奈良県立医科大学医学部第二生理学²

國安 弘基¹, 笹平 智則¹, 森若 優希子¹, 三澤 裕美², 高木 都²

ES 腸管形成において ES 細胞は付着培養後徐々にドーム状の隆起構造を形成するが、その内の一部のみが運動能を有する。この腸管様形態と運動能との関係について組織学的な検討を行った。培養後 21 日では 25 個のドーム状隆起の内 10 個に収縮性運動が認められた。運動性・非運動性のドーム状隆起をパラフィン包埋し連続切片を作成、免疫染色により運動性の有無による組織構築の違いを検討した。運動性ドームでは、内面は cytokeratin (CK)陽性・Trefoil factor 3 (TFF3)陽性の粘膜上皮へ分化を示す細胞に覆われ、外側に Smooth muscle actin (SMA)陽性の平滑筋分化を示す細胞層が存在する正常腸管に類似する上皮→平滑筋の極性が保たれていた。これに対し、非運動性ドームの内 9 個においては CK・TFF3 発現は不明瞭で、壁全体に弱い SMA 発現が見られ組織極性は不明瞭であった。同様に、S100・c-Kit (Kit)の発現を検討すると、運動性ドームでは集簇巣を伴って S100 陽性細胞が壁内に見られ、Kit 陽性細胞が散在するのに対し、非運動性ドームでは S100 陽性細胞は見られず Kit 陽性細胞はごく少数のみであった。次に組織極性に影響を与える因子として hedgehog 系因子及び Wnt 系転写因子 Sox9 の発現を検討すると、運動性ドームでは Sonic hedgehog (SHH), Patched (PTC), Smoothen (SMO), Sox9 各々の陽性細胞は内腔側に密・外側に疎な分布を示したのに対し、非運動性ドームでは SHH・PTC・SMO 陽性細胞は外側に、Sox9 陽性細胞は壁全体に分布していた。これらの所見から、Hedgehog/Wnt 系因子による組織極性の形成が、ES 腸管構造とその運動能に影響を与えることが示唆された。

シンポジウム 2 平滑筋の EC-Coupling

S-6. 平滑筋収縮制御の分野での江橋節郎先生のされたお仕事とその現代的手法による確認：途中経過

群馬大学大学院医学系研究科臓器病態薬理学

小濱 一弘

私の恩師江橋節郎先生は平成 18 年 7 月 17 日、享年 83 歳でお亡くなりになりました。先生のトロポニンのお仕事はあまりにも有名で、解説の必要もないでしょう。EC-coupling 上、Ca²⁺ 結合蛋白質であるトロポニンは収縮エレメント側の担い手ではありますが、骨格筋と心筋において機能しています。本シンポジウムの扱う平滑筋においてはトロポニンは見つからず、ミオシン軽鎖をリン酸化するミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK と略す) が、カルモジュリンを Ca²⁺ 受容体として機能しています。先生は平滑筋のアクチンとミオシンが相互作用を起こすには、活性化因子が必要であり、この点が骨格筋や心筋の制御と異なることを、1960 年代半ばに発表されています。東京大学を定年退官されたのち、生理学研究所にうつられ、活性化因子の精製を自らの手で始められました。精製されたこの 155 kDa 制御蛋白の部分配列より、cDNA をクローニングされたところ、MLCK の配列が出てきました。しかし、先生はくじけませんでした。MLCK の構造は、中央にキナーゼドメインがあるもの、N 末端と C 末端にはそれぞれアクチン結合部位とミオシン結合部位を有することから、キナーゼ活性以外の機能を持つと考えたのです。いわば、MLCK の non-kinase 作用とでも言うべき機能であります。先生はこのお仕事の途中、脳梗塞で倒れられ、リハビリテーションを続けられていました。私は弟子として、先生のとられた cDNA を発現蛋白として得て差し上げようと考え、やっとのことで、全長を機能ある形で発現させることができました。これはお伝えできたのですが、MLCK に変異をかけてキナーゼ活性を失活させてもなおかつ、アクチンとミオシン相互作用かける制御作用が残っていることはお知らせできませんでした。今回は、この変異 MLCK の non-kinase 作用についても触れることとします。

S-7. 平滑筋収縮タンパク質フィラメント構造の動態と収縮弛緩反応

東京医科大学細胞生理学講座¹、独立行政法人科学技術振興機構、CREST²

渡辺 賢^{1,2}、小比類巻 生²

脊椎動物平滑筋細胞—少なくともその一部の種類—では、収縮タンパク質であるミオシンやアクチンの重合・脱重合が生理的に行われている。それに伴って、太いフィラメント (重合ミオシン+制御タンパク質) や細いフィラメント (重合アクチン+制御タンパク質) の細胞内分布が量的・空間的に変化する。この様な筋収縮タンパク質フィラメントのダイナミックな振る舞い、リモデリングと、病的平滑筋収縮の関連が指摘されており、現在、主にリモデリングにかかわる細胞内情報伝達機構に関心が集まっている。一方で、平滑筋細胞におけるリモデリングと収縮弛緩サイクルとのかかわりは、1) *in vitro* 実験系における筋収縮タンパク質フィラメント形成・解離のふるまいと平滑筋細胞内でのリモデリングの実態はかなり異なっている、2) 生筋細胞ではリモデリングの制御が困難であるために、その詳細は未だ不明である (例えば Seow CY. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1363-8, 2005)。最近、演者らは、II 型ミオシンの特異的阻害薬であるプレビスタチンが、平滑筋スキンド標本の収縮を抑制するのみならず、平滑筋細胞の太いフィラメント・細いフィラメントの配列構造を乱すことを見出した (Watanabe M, Kohama K, et al. *J Physiol Sci* 57: S67)。プレビスタチンは平滑筋収縮タンパク質リモデリング研究におけるツールとして有用であることが示唆された。

S-8. 平滑筋収縮のカルシウム感受性増強の分子機構

山口大学大学院医学系研究科器管制御医科学講座生体機能分子制御学

小林 誠

Rho キナーゼ (ROK) を介するカルシウム感受性増強 (Ca^{2+} -sensitization) は、血管攣縮などの血管異常収縮の原因とされている。我々は ROK の上流因子を探索しスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定したが、SPC は実際にヒト血管病の際に高値となる事が見出され、ヒト血管攣縮の原因分子として注目されている。さらに我々は、SPC と ROK の間を仲介する分子として Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) を見出したが、Src-TK の中でも、どの TK 分子が関与しているか、4 つの方法、即ち、1) RNA 干渉 (siRNA) による候補分子のノックダウン、2) 候補分子の活性型・不活性型プラスミドによる過剰発現、3) リコンビナント蛋白 (活性型・不活性型) を β エスシン-スキンド血管条片へ投与、4) 候補分子の活性測定、により検討し、Fyn が関与している事を証明し、さらにタンデム型質量分析計を用いたリン酸化プロテオミクスにより、Fyn の下流の候補分子とそのリン酸化部位を同定した。一方、ヒト血管平滑筋において、SPC 反応性は、血清の総 Chol 値や LDL-Chol 値と正の相関を、HDL-Chol 値とは逆相関を示した。SPC により、Fyn と ROK は、Chol 局在膜ドメインである膜ラフトへ移動した。 β -cyclodextrin による細胞膜 Chol の除去によって、膜ラフトを消失させると、SPC による Fyn と ROK の移動および収縮は抑制された。以上より、 Ca^{2+} -sensitization の分子機構として、Fyn、膜ラフトが重要である事が明らかとなった。最後に、 Ca^{2+} 動態や Ca^{2+} による収縮には影響せず、 Ca^{2+} -sensitization のみを抑制できる薬物を見出したので報告する。

S-9. リアノジン受容体の機能的発現のスイッチング

東京大学大学院医学系研究科細胞分子薬理学教室

中村 直俊, 山澤 徳志子, 飯野 正光

多くの興奮性細胞や非興奮性細胞の小胞体カルシウムストア上には、リアノジン受容体とイノシトール三リン酸 (IP_3) 受容体の 2 種類のカルシウム放出チャネルが発現しており、種々の細胞機能の制御に不可欠な細胞内カルシウム動態を形成している。この両チャネルの発現については、両方を発現している細胞、片方のみを発現している細胞や、発現パターンの異なる複数のカルシウムストアをもつ細胞など、さまざまな報告があり、そのメカニズムや意義に関する定説はない。我々は以前、モルモットの門脈や盲腸紐の平滑筋細胞において、複数のカルシウムストアが見られることを報告している。HEK293 細胞は、約 4 割の細胞のみが機能的なリアノジン受容体を発現する一方で、すべての細胞が機能的な IP_3 受容体を発現するという特徴をもち、両チャネルの発現を研究するよいモデル系であると考えられる。我々はまず、HEK293 細胞においても、上記の平滑筋細胞と同様、リアノジン受容体を発現するカルシウムストアと IP_3 受容体を発現するカルシウムストアが一部オーバーラップしていることを見出した。さらに、限界希釈法によって作製した HEK293 細胞のサブクローンにおいても、機能的なリアノジン受容体を発現する細胞と発現しない細胞の 2 種類の細胞が観察されることを確認した。すなわち、単一の細胞が分裂を繰り返すことによりリアノジン受容体を機能的に発現する細胞と発現しない細胞に別れることが示唆された。さらにこれを支持する証拠として、我々は個々の HEK293 細胞の経時的カルシウムイメージングにより、リアノジン受容体の機能的発現が時間とともにオンになったりオフになったりする「スイッチング」現象を見出した。以上の結果から、リアノジン受容体の機能的な発現を制御するスイッチング機構の存在が示唆された。

シンポジウム 3 消化管機能からみた消化器疾患の病態と治療

S-10. 胃切除後の消化管機能からみた機能温存術式の有用性について

東京慈恵会医科大学外科学

中田 浩二, 川崎 成郎, 二村 浩史, 鈴木 裕, 三森 教雄, 羽生 信義,
柏木 秀幸, 矢永 勝彦

幽門側胃切除 (DPG) 後の胃術後障害発生を軽減する目的で迷走神経肝枝・腹腔枝の温存 (DPGpv) や幽門保存胃切除 (PPGpv) が行われているが, これら機能温存手術が術後 QOL や消化管機能に及ぼす影響は十分に明らかにされていない。【目的】各胃切除後の長期 QOL と消化管機能を比較し機能温存手術の臨床的意義を検討した。【方法】教室で早期胃癌に対し胃切除術が施行され, 術後 2 年以上経過しアンケートで回答が得られた DPG 86 名, DPGpv 22 名, PPGpv 21 名の体重減少率, ダンピング症状, 下痢, 胆石の発生率を比較検討した。また健常人 (HV) 12 名, DPG 12 名, PPGpv 10 名に ^{13}C 法胃排出能検査「標準法」(200 kcal/200 ml の液状食に ^{13}C -acetate Na 塩 100 mg を混和し, 摂取後 240 分まで呼気を採取) による消化管機能評価を行い, 胃排出速度 (T1/2, 胃排出曲線 [Wagner-Nelson 解析]) と吸収能 (AUC-Tmax [体重補正值]) を比較検討した。【成績】DPG 患者, DPGpv 患者, PPGpv 患者における体重減少率は各々平均 12.5%, 9.3%*, 7.2%* であった。またダンピング症状 (全身症状) 発生率は各々 36%, 27%, 19% (NS), 下痢の発生率は各々 60%, 19%*, 16%*, 胆石発生率は各々 18%, 15%, 0%* (* $p < 0.05$ vs. DPG) であった。試験食摂取後 30 分までの胃内残存率と T1/2 は HV > DPG 患者 > PPGpv 患者 (各群間で有意差あり; $p < 0.05$) であり, AUC-Tmax [体重補正值] は各々平均約 18.4, 9.7*, 18.0 $\Delta\% \cdot \text{hr}$ (* $p < 0.05$ vs. HV, PPGpv) であった。【結論】DPGpv, PPGpv では DPG と比べ体重減少と下痢の発生が有意に少なく, ダンピング症状発生率の減少傾向がみられた。PPGpv では胆石発生率の有意な減少がみられた。DPG では有意な胃排出亢進と吸収能低下がみられたが, PPGpv では胃排出亢進が軽減され吸収能は保持された。以上より DPGpv, PPGpv はともに臨床的に有用な機能温存手術である。

S-11. 経鼻内視鏡や体外式超音波, 胃透視を用いた十二指腸ブレーキに対するアプローチ

川崎医科大学内視鏡・超音波センター¹, 川崎医科大学食道・胃腸内科²

楠 裕明¹, 石井 学², 春間 賢²

【背景】食直後に内容物の一部は十二指腸内に流出する。この現象は Initial Gastric Emptying と呼ばれ, この増加は過度の十二指腸ブレーキや近位胃拡張不良を引き起こし, 胃排出にも影響を及ぼすため functional dyspepsia (FD) の病態生理のひとつとして注目されている。【目的】経鼻内視鏡や体外式超音波法, 胃透視で十二指腸ブレーキの評価を試みる。(1) 経鼻内視鏡での検討【対象】腹部症状を持たない健常人 (HV) 10 名 (男性 6 例, 年齢 22~38 歳)。【方法】経鼻内視鏡下に十二指腸内に 0.1 N の塩酸および水を 100 ml 投与し, 直視下で前庭部収縮を 2 分間隔で評価した。【結果】水投与で収縮回数に変化はなく, 酸投与で著明に減少した (水: 前 5.7 ± 0.3 , 後 5.5 ± 0.17 , 酸: 前 6 ± 0.27 , 後 0.88 ± 0.64)。 (2) 超音波での検討【対象】FD 3 例, HV 10 例。【方法】200 ml, 200 kcal の液体食を経口投与し, 超音波で十二指腸流入を確認し, その後の前庭部収縮を評価した。【結果】全例で投与後に前庭部収縮の消失を認めた。FD は HV と比較し, 消失までの時間は小さく (FD: 163, HV: 229 秒), 消失の持続時間は大きい (FD: 397, HV: 148 秒) 傾向があった。 (3) 透視での検討【対象】2006 年 9 月から 10 月に岡山健康づくり財団で胃検診を受診した 495 例 (男性 227 例, 平均年齢 59.1 歳)。【方法】間接撮影写真読影時に, traitz 靱帯より口側にバリウムが流出した (流出陽性) 症例と, しなかった (流出陰性) 症例に分け, 問診表で自覚症状を比較した。【結果】流出陽性例は 227 例であり, 問診で自覚症状は 55 例に認めた。流出陰性例は 268 例であり, 自覚症状は 34 例に認めた。【結語】それぞれの方法で十二指腸ブレーキの評価は可能であり, FD 病態解明の一助となる可能性がある。

S-12. タキキニン NK2 受容体刺激によるモルモット大腸粘膜からのセロトニン放出に及ぼすチロシンキナーゼ阻害薬の効果

獨協医科大学薬理学¹, 獨協医科大学医総研²

児嶋 修一¹, 池田 雅志², 上川 雄一郎¹

【目的】セロトニン(5-HT)は、大腸の運動機能や分泌機能に影響する重要な伝達物質である。大腸における5-HTの大部分は、粘膜エンテロクロマフィン細胞に貯蔵されているが、大腸粘膜からの5-HT放出制御機構の正確なメカニズムはまだ明らかにされていない。これまでに我々は、タキキニンNK2受容体刺激薬である[β -Ala⁸]-neurokinin A 4-10 (β Ala-NKA)が大腸粘膜に分布するタキキニンNK2受容体の刺激を介して大腸粘膜からの5-HT放出を促進することを明らかにしてきた(Br. J. Pharmacol. 2004, 141: 385)。今回我々は、NK2受容体刺激による5-HT放出機構におけるチロシンキナーゼ(PTK)の役割を明らかにするために、 β Ala-NKAによる5-HT放出に及ぼすPTK阻害薬の効果を検討した。【方法】常法により雄性モルモットから大腸を摘出し、短冊型の大腸標本を作製した。摘出大腸標本からの5-HT遊離量はHPLC/電気化学検出器を用いて測定した。【結果と結論】 β Ala-NKAは濃度依存的に大腸標本からの5-HT放出を増強した。PTK阻害薬 genistein (GST)は、濃度依存的に β Ala-NKAの5-HT放出促進作用を増強したが、GSTの構造類似体でPTK阻害作用をもたない daidzein は β Ala-NKAの作用に対し何ら影響を及ぼさなかった。GSTとは構造的に異なるPTK阻害薬DHCAもまた β Ala-NKAの作用を増強した。以上の結果から、PTKの阻害はタキキニンNK2受容体刺激による大腸粘膜からの5-HT放出を増強するものと考えられる。

S-13. 肝外胆管再生過程の組織学的検討—平滑筋再生を中心に—

埼玉医科大学消化器一般外科¹, 奈良県立医科大学²

宮澤 光男¹, 合川 公康¹, 鳥井 孝宏¹, 岡田 克也¹, 大谷 吉秀¹, 小山 勇¹,
筏 義人²

胆管再生の検討は、過去においては胆管結紮モデル、あるいは、肝内胆管に関するものが中心であり、肝外胆管が成熟するまで再生を検討することは不可能であった。我々は、生体吸収性ポリマーで作製した人工胆管(ABD)をnativeの肝外胆管と置換すると、その移植部分に胆管上皮細胞が再生し、nativeと同様の胆管が再生してくることを示した(Am J Transplant 2005, 1541)。この移植モデルを用い、肝外胆管の平滑筋がどのように再生するか組織学的に検討した。(方法)生体吸収性ポリマーで作製したチューブ状の人工胆管(ABD)を用い移植実験を施行した。ABDには移植前、細胞等は播種しなかった。雑種ブタをABD移植のレシピエントとした。胆嚢管合流部付近の総胆管を切断後、総胆管の十二指腸側を結紮。肝側のnativeの総胆管の断端とABDを吻合した。さらに、十二指腸下降脚に5mm大の穴をあけ、ABDの他方断端とその十二指腸の穴を縫合した。neo-bile ductは移植後経時的に採取し組織学的に観察した。筋芽細胞のマーカーとしてdesmin染色を用いた。(結果と考察)ABD移植7週において、ABD移植部の再生胆管は均一に再生しており、十二指腸側、肝臓側どちらから優位に再生しているという事はなかった。ABD移植後3.7週において、desmin陽性細胞が胆管上皮下にほぼ均等に認められた。ABD移植後12w, 6ヶ月も十二指腸側からあるいは、肝臓側からdesmin陽性細胞が連続して分布するのではなく、再生胆管に均等に認められた。そのdesmin陽性細胞の量は経時的に増加した。移植後6ヶ月でもnativeの肝外胆管よりdesmin陽性細胞量は少量であった。(結語)このモデルの肝外胆管再生においては、末梢循環細胞がポリマー移植部分に生着し、分化し、ポリマー移植部分に均等に平滑筋が再生してくるものと考えられた。

S-14. 直腸癌術後の排便障害について

鹿児島大学医学部小児外科学¹, 聖路加国際病院小児外科², 聖路加国際病院外科³

松藤 凡¹, 中村 晃子², 大東 誠司³

【緒言】排便は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, これには腸管神経系と仙骨神経系が重要な役割を果たしていることを報告してきた. 直腸癌に対する低位前方切除術では, 消化管の連続性は再建により保たれているが, 術後に Fragmentation と呼ばれる排便障害が生ずることがある. このような症例に誘発排便時の結腸, 直腸, 肛門の運動を内圧法を用いて観察がした. 【対象】直腸癌に対して低位前方切除術が行われ, 術後長期に排便困難をきたした 5 例. 【方法】肛門よりを 5 mm, 10 mm, 15 mm, 20 mm, 7 cm, 12 cm, 17 cm, 22 cm の 8 カ所で内圧を測定できるカテーテルを作成した. 測定には pneumohydrostatic perfusion system を用いた. この方法では, 吻合部口側結腸, 吻合部肛門側直腸ならびに肛門の内圧が同時に測定できる. カテーテルを通して吻合部口側にグリセリンを注入して排便を誘発した. 【成績】コントロール群では, 誘発排便時には, High Amplitude Propagated Contraction (HAPC) 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. 直腸癌術後排便機能症例では, 便意が生じた時点で口側結腸には HAPC が出現し肛門側へと伝播するが, 吻合部を超えて伝播するものはなかった. 内肛門括約筋の弛緩も認められなかった. 多くの患者は長時間のいきみとともに便を排泄した. 【考察】本術式では肛門と残存直腸へ分布する自律神経(仙骨神経)は切断されている. また, 直腸を切除するため腸管壁内神経の連続性も絶たれている. このことが HAPC の伝播障害, 内肛門括約筋との協調運動障害と推測される. 自律神経の温存術式や吻合部を超えた壁内神経の再生などを促すことが課題である.

S-15. 脊髄の排便中枢を介するグレリンの結直腸運動亢進作用

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学教室¹,

Anatomy and Cell Biology, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australia²

志水 泰武¹, Shafton Anthony D.², 椎名 貴彦¹, 武勝 義¹, Furness John B.²

【背景と目的】胃腸管に存在するペプチド性因子は, 一般的に消化管の運動性や分泌機能に大きな影響を与える. しかしながら, 胃で合成分泌されるグレリンについては, 成長ホルモンの分泌促進や食欲亢進といった中枢を介する作用がよく知られているが, 消化管に対する作用ははっきりしていない. 本研究では, ラットを用いた *in vivo* の実験により, 消化管の運動性に対するグレリンの作用を明らかにすることを目的とした. 【方法】実験には SD ラット雄を用い, 大腿動脈に設置したカテーテルから α クロラロースとケタミンの混合液を持続的に注入し, 安定した麻酔状態を維持した. 結腸に切開を入れ, 内容物を取り出した後, カニューレを設置した. 肛門側からも同様にカニューレを挿入し, 圧トランデュースーにつなぎ腸管内腔の圧変化を記録するとともに, 推送された液量を測定した. また, 無麻酔のラットの皮下に薬物を投与し, 単位時間あたりの糞便排泄量を測定した. 【結果】中枢へ容易に移行するグレリンアゴニスト (CP464709) を静脈内に投与すると, 強い結直腸の蠕動が誘発された. このことと良く一致して, 無麻酔無拘束のラットにこの薬物を皮下投与した場合, 糞便排泄が引き起こされた. 腰仙髄部 (L6-S1) にある排便中枢への CP464709 投与により, 結直腸の運動性亢進が再現された. 脊髄から結直腸への神経連絡を遮断するために, 馬尾を外科的に切断したところ, 静脈内に投与した CP464709 の効果が消失した. また, 糞便排泄中枢へ CP464709 を高濃度注入し脱感作を引き起こすことによっても, CP464709 による結直腸の運動性亢進は見られなくなった. 一方, CP464709 は小腸の運動性には影響しなかった. 【結論】グレリンアゴニストは, 腰仙髄部の排便中枢を活性化し, 結直腸の運動性を亢進させ, 糞便の排泄を促すことが明らかとなった.

S-16. 直腸肛門反射における壁内神経の可塑性

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,
奈良県立医科大学医学部分子病理³

勝井 錬太^{1,2}, 國安 弘基³, 藤井 久男², 中島 祥介², 高木 都¹

【目的】モルモット直腸切離吻合モデルを用いて、壁内神経切断後の排便反射の経日的変化、吻合部の組織学的変化を術後1-8週間検討し、直腸肛門反射経路に関与する壁内神経の可塑性について報告する。【方法】モルモットを開腹後、肛門縁より3cmの直腸を切離吻合した。排便反射〔直腸-直腸反射(R-R反射)および直腸-内肛門括約筋反射(R-IAS反射)〕の測定は全身麻酔・人工呼吸下で、肛門縁より5cmの直腸に挿入したバルーンを加圧伸展した時の直腸内圧変化およびIAS張力変化の記録により行った。また、慢性腰仙髄破壊モルモットにおいて排便反射促進作用を示した5HT₄ agonist (mosapride citrate)の効果の経日的変化や、脳由来神経栄養因子(BDNF)局所投与後の排便反射・吻合部の組織学的形態の経日的変化についても検討した。【結果】R-R反射反応はいずれの期間でも非手術例のコントロール群(C群)と有意差は認めなかった。R-IAS反射反応は術後1-4週目でC群に比べて有意に減少したが、8週目ではC群と有意差を認めないほど回復した。吻合部組織像の検討により、この時期に一致して吻合部を越えてつながる神経線維が観察された。さらに、Mosaprideはこの時期に一致して、R-RおよびR-IAS反射反応を増強した。BDNF局所投与群ではR-IAS反射反応の回復は術後2週目で見られ、吻合部を連絡する神経線維を認めた。さらに、吻合部においてBDNFの受容体であるTrkB陽性細胞やNF陽性細胞の数が有意に増加していた。【結語】直腸切離吻合術後、R-IAS反射の経日的回復がみられ、それに伴う壁内神経系の再生が示された。Mosaprideは壁内神経系の再生に伴い排便反射の増強作用を示した。さらに、BDNF局所投与は壁内神経の可塑性を促進し、R-R反射とR-IAS反射からなる排便反射の回復を短縮させた。

シンポジウム 4 自律神経支配臓器の神経性機能調節

S-17. マウス食道運動に対する抑制性神経調節

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学教室¹, Erlangen-Nuremberg 大学第一解剖学教室²

椎名 貴彦¹, Boudaka Ammar¹, 志水 泰武¹, Woerl Juergen², Neuhuber Winfried²,
武勝 義¹

【背景と目的】マウス食道の筋層は横紋筋で構成されている。これまで形態学的な検討から、食道横紋筋は、迷走神経と内在神経による二重の神経支配を受けていることが明らかにされている。このような特徴は、迷走神経のみならず内在神経も食道運動の制御に関与することを示唆するものであるが、これを明らかにした報告はほとんどない。カプサイシンは、Transient receptor potential ion channel of the vanilloid type 1 (TRPV1) を介して、感覚神経に作用する。カプサイシン感受性神経は内在神経の活性に影響し、消化管運動を制御する。一方、ピペリンという胡椒の辛み成分もカプサイシンと同様に、感覚神経を刺激することが知られている。本研究では、マウス食道の横紋筋収縮を制御する内在神経の役割を明らかにすることを目的とし、食道の迷走神経性横紋筋収縮反応に対するカプサイシンとピペリンの効果について比較検討した。【方法】マウスから食道を分離し、オルガンバス中にて、フォーストランスデューサーを用いて食道運動を記録した。【結果と考察】迷走神経の電気刺激によって誘発されたマウス食道横紋筋の収縮反応は、カプサイシンあるいはピペリンを作用させることによって、抑制された。TRPV1 拮抗薬は、カプサイシンの抑制効果は阻害したが、ピペリンの効果には影響しなかった。また、カプサイシンの前処置により TRPV1 の脱感作が生じたのちも、ピペリンは迷走神経性収縮を抑制した。さらに、カプサイシンの抑制作用は、タキキニン受容体阻害薬や一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害薬によって阻害されたが、ピペリンの作用は影響されなかった。以上の結果より、マウス食道には、TRPV1 依存性および非依存性の 2 種類の抑制性神経調節経路が存在していることが示唆された。

S-18. 中枢摂食亢進ペプチドによるラット胃近位部の弛緩応答

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔生理学分野

小橋 基, 美藤 純弘, 藤田 雅子, 松尾 龍二

我々はこれまで視床下部に存在する摂食亢進ペプチドのオレキシン A やニューロペプチド Y が、迷走神経背側複合核群 (dorsal vagal complex: DVC) に作用して、胃近位部の弛緩を惹起することを明らかにしてきた (Neurosci Lett 332: 171-174, 2002; Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290: R290-R297, 2006)。この現象は、摂食に適応するため胃の貯留能を増加させる応答だと考えられる。グレリンは胃組織から精製され、成長促進作用と共に摂食亢進作用をもつことが明らかとなっている。また、中枢にもグレリン含有細胞が存在する。グレリンが上部消化管に空腹期収縮様の運動を惹起することは既に知られているが、食物貯留能を持つ胃近位部への作用は知られていない。そこで今回我々は、グレリン中枢投与の胃近位部収縮性におよぼす効果を、ウレタンクロラロス麻酔下のラットを用いて検討した。グレリンの第四脳室内投与により胃近位部に用量依存性の弛緩が観察された。グレリン受容体 (GHS-R) のアンタゴニストである [D-Lys³]-GRP-6 とグレリンの同時投与では、胃近位部の弛緩は観察されなかった。また両側頸部迷走神経の切断後は、グレリン投与による弛緩は観察されなかった。さらにグレリンを DVC 内に微量注入し胃近位部の内圧変化を観察した結果、門より吻側部への注入よりもむしろ尾側部への注入の方が強い弛緩を惹起した。これは以前にニューロペプチド Y で得られた結果と同様である。これらの結果から、グレリンは尾側 DVC のニューロンを介して迷走神経経路で胃近位の弛緩をもたらすことが明らかとなった。

S-19. 迷走神経が低気圧環境での胃運動調節に果たす役割

奈良女子大学大学院人間文化研究科統御生理学¹, 日本海洋科学技術センター²

三木 健寿¹, 吉本 光佐¹, 榎木 暢雄², 毛利 元彦²

【目的】高山病の代表的な自覚症状に消化管運動に関連した食欲減退, 吐き気, 嘔吐, 腹痛などが古くから知られている。本実験は, 意識下のラットに 0.5 気圧急性暴露(キリマンジャロに相当する高所環境)し, 低気圧環境が胃の運動に及ぼす影響および, その調節にはたす胃迷走神経の役割について検討した。【方法】Wistar 系ラットを用い, 胃の運動を計測するためにストレインゲージトランスデューサーを慢性留置した。手術後 1 日以上回復期を待ち, 自由行動下にて実験を行った。プロトコルは, 1 時間の 1 気圧でのコントロール期, 1 時間の 0.5 気圧の急性低気圧暴露, 1 時間の 1 気圧での回復期より成る。また, 胃の迷走神経枝を切除した群で同様の実験を行い, 無処置群と胃迷走神経切除群との差を検討した。【結果】0.5 気圧の低気圧暴露により, 胃の収縮回数は, 無処置群では 5.6 ± 0.1 回/分から 5.1 ± 0.1 回/分に, 胃迷走神経切除群では 5.6 ± 0.1 回/分から 5.0 ± 0.1 回/分に減少した。0.5 気圧暴露による胃の収縮回数の低下は無処置群と胃迷走神経切除群に差は無かった。しかし, 胃の収縮波の面積はコントロール期を 100% とすると, 無処置群では 0.5 気圧暴露により $64.6 \pm 4.0\%$ 有意に低下したが, 胃迷走神経切除群では収縮波の面積は 0.5 気圧暴露により変化しなかった。【結論】本実験は, 低気圧暴露により無処置群では胃の運動が抑制されることを示した。その抑制のメカニズムとして, 胃の迷走神経が胃の収縮波の面積の減少を引き起こしていることが示された。これは, 胃迷走神経は高所での胃の運動抑制に関与し, 胃の内容物の排出抑制を引き起こしている可能性を示唆する。

S-20. 体性感覚神経を介する自律機能の反射性反応—卵巣血流を例として

国際医療福祉大学基礎医学研究センター

黒澤 美枝子, 下重 里江

種々の自律機能が内臓からの求心性情報によって反射的に調節されることは良く知られている(内臓—内臓反射)。一方, 自律機能は皮膚や筋・関節などの体性感覚情報によっても反射性の調節を受ける(体性—内臓反射)ことが明らかにされてきており, 体性—内臓反射は体表からの刺激(例えば, マッサージ, 温並びに冷湿布, 鍼灸など)が内臓機能におよぼす効果を説明するメカニズムの一つと考えられている。本シンポジウムでは, 最近私どもが研究している卵巣血流を例にして, 皮膚・骨格筋への電気刺激の影響とその自律神経性機序を紹介する。特に刺激部位, 刺激頻度, 脊髄性の反応, 性周期の違いに着目した。実験には発情期と発情間期のラットを用いた。ラットはウレタンで麻酔し, 人工呼吸器を用いて呼吸を維持した。開腹後, 左側卵巣表面にレーザードップラー血流計プローブを置き, 卵巣血流を連続測定した。ステンレス針 2 本(間隔 12 mm)を左側の腓腹筋あるいは腹筋に刺入し, 強度 10 mA で, 2 Hz, 10 Hz, 80 Hz の頻度の刺激を 30 秒間加えた。その結果, 腹筋への 10 Hz 刺激によって卵巣血流は増加したが, 腹筋および腓腹筋への 80 Hz 刺激, 腓腹筋への 10 Hz 刺激によって卵巣血流は減少した。2 Hz 刺激によって卵巣血流は変化しなかった。腹筋刺激による卵巣血流反応は発情期の方が発情間期に比べて大きかった。卵巣血流反応は卵巣支配交感神経の切断並びに脊髄切断後, 消失した。これらの事実より, 腹筋並びに腓腹筋への刺激によって卵巣血流は, 卵巣交感神経を介して反射的に変化すること, その反応は脊髄より上位の中枢を介すること, が明らかとなった。また, 腹筋への刺激(分節性の刺激)時に, 卵巣血流の反応は刺激頻度に依存し, 性周期の影響を受けることが示された。卵巣血流は排卵機能と密接に関わることが知られていることから, 体性感覚刺激が排卵機能に影響を与える可能性が示唆された。

シンポジウム 5 子宮収縮の基礎と臨床

S-21. 塩酸リトドリンと硫酸マグネシウムの子宮平滑筋イオンチャンネルへの作用の相違に関して—子宮収縮抑制剤併用療法確立のため基礎的検討—

広島大学大学院医歯薬学総合産婦人科

三好 博史, 占部 智, 島筒 里香子, 工藤 美樹

切迫早産治療の主体は子宮収縮の抑制であり、本邦においては β_2 受容体作働薬である塩酸リトドリンが早産治療薬の第一選択となっている。最近、硫酸マグネシウム製剤が正式に切迫早産治療薬として認可された。これにより塩酸リトドリンが使用できない症例や副作用により有効濃度を維持できない症例などへの投与が可能となった。硫酸マグネシウムは歴史的に早産治療目的で使用されてきたが、特に両者の併用に関しての基礎的検討は十分とはいえない。そこで、イオンチャンネルによる子宮平滑筋細胞の膜電位制御の観点から各薬剤の作用の相違を示す。 β_2 受容体作働薬は細胞内 cAMP 濃度上昇により Ca の貯蔵を促進し、膜電位に関しては過分極させて収縮を抑制すると報告されている。我々は Gap 結合の透過性を約 15% 低下し細胞間の興奮伝搬を抑制することを示した。一方、Mg イオンは L 型 Ca チャンネルを抑制するのみではなく、特に子宮収縮には促進的に働く非選択性陽イオンチャンネル (NSCC) に高い感受性を示した。単一子宮平滑筋細胞からパッチクランプ法にて単離した NSCC 電流は Mg^{2+} 濃度 0.01-10 mM において濃度依存性に ($K_d=0.28$ mM) 抑制された。また、ATP 受容体電流も同様の濃度域において Mg^{2+} に高い感受性 ($K_d=0.26$ mM) を示しており子宮平滑筋細胞における作用点であることが示唆された。一方、 β_2 受容体作働薬は両者に対して効果を示さなかった。イオンチャンネル型 ATP 受容体である P2X 受容体の発現様式を検討したところ P2X4 および P2X7 の優位の発現を認めた。また、妊娠期間中の発現を定量したところ両者はともに妊娠末期にむけて発現が亢進しており分娩時における子宮収縮との関連性が推測された。塩酸リトドリンと硫酸マグネシウムは子宮平滑筋イオンチャンネルに対する作用が異なり併用は相乗効果をもたらすことが期待された。

S-22. Lipopolysaccharide 処理ラット妊娠子宮筋の収縮反応に対する Prostaglandins 及び IP3 の関与

福島県立医科大学産婦人科

大川 敏昭, 高橋 秀憲, 佐藤 章

【目的】早産の原因の多くに細菌感染の関与が示唆されている。そこで Lipopolysaccharide (LPS) 処理の妊娠 17 日目 (早産期) のラット子宮筋を用いて Oxytocin (OXT) による筋収縮の感受性の変化及び Prostaglandins (PGs) と inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) の関与について検討した。【方法】(1) LPS (1.5 mg/kg) 処理または処理 1 時間前に Indomethacin (IND) 投与したのを各々、Cont 群、LPS 群、IND 群、LPS-IND 群とした。子宮より縦走筋標本を作成し、Krebs-Ringer 液中で、OXT による収縮を等尺性に記録した。(2) 同時に bath 中の $PGF2\alpha$ 、 $PGE2$ 産生量及び組織中の IP3 産生量を RIA 法にて測定した。【成績】(1) OXT 用量反応曲線における EC50 の値 [対照群、LPS 群] ($M \pm SD$) は、 $[2.10 \pm 0.39, 2.63 \pm 0.26]$ であり、LPS 群において曲線は左に有意 ($p < 0.05$) に偏位した。IND 投与において、EC50 値は [IND 群、LPS-IND 群] $[2.12 \pm 0.30, 2.51 \pm 0.33]$ であり、IND により、LPS 群の曲線が左に偏位するのを抑制した。(2) 自然収縮時より [$PGF2\alpha$ 、 $PGE2$] とともに LPS 群 $[51.0 \pm 15.5, 50.1 \pm 16.0]$ (pg/mg wet weight tissue/10 min, mean \pm SE, $n=8$) では Cont 群産生量 $[38.3 \pm 4.2, 36.1 \pm 13.2]$ に比して増加傾向を呈しており、OXT を投与すると $PGF2\alpha$ は約 3 倍、 $PGE2$ では約 5 倍と有意に上昇した ($p < 0.05$)。OXT 投与後の $PGE2$ 産生量の上昇率は LPS 群の 5 倍に対し、LPS-IND 群では、約 2 倍と抑制された。 $PGF2\alpha$ 産生量は LPS-IND 群では、わずかに増加したに過ぎず、LPS 群より有意に減少した ($p < 0.01$)。IP3 においては、LPS 群は OXT を投与すると Cont 群に比して IP3 産生量が有意に増加していた。【結論】LPS は OXT に対する妊娠子宮筋の感受性を亢進させた。この機序には PGs や IP3 産生亢進が深く関与していることが示唆された。

S-23. 早産とサイトカイン

秋田赤十字病院総合周産期母子医療センター

平野 秀人

絨毛膜羊膜炎 (CAM) は早産の主な原因である。卵膜の組織検査による Blanc 分類は CAM の程度をあらわす指標として用いられている。早い妊娠週数の早産ほど、高度な CAM (Blanc 分類 stage3) が関与している。すなわち、分娩時の妊娠週数が 22~25 週, 26~29 週, 30~33 週, 34 週以降の場合, stage3 の CAM を認めた割合は、それぞれ 59%, 31%, 8%, 0% であった。羊水中の炎症性サイトカインレベルは、CAM の程度ともに上昇する。羊水採取後 48 時間以内に分娩に至った切迫早産 60 例を CAM (-) あるいは stage1 ($n=17$), stage2 ($n=22$), stage3 ($n=21$) の 3 群に分けると、羊水中 IL-8 値 (平均値 (pg/ml)) は、それぞれ 2,993, 13,112, 46,235, IL-6 値は 5,225, 30,853, 84,953, と stage 毎に上昇した。IL-1 β は 50, 29, 2005 と stage3 において著高値を示した。切迫早産の発症時期を妊娠 28 週末満 ($n=60$), 28~31 週 ($n=29$), 32 週以降 ($n=22$) の 3 群に分けると、入院時の羊水中 IL-8 値 (平均値 (pg/ml)) は、それぞれ 11,897, 4,536, 1,785, IL-6 値は 14,313, 9,510, 6,251 と早い妊娠週数の切迫早産ほど、高値を示した。IL-1 β 値は 640, 49, 36 と妊娠 28 週末満で著高値を示した。切迫早産 (PROM を除く 105 症例) のため入院してから分娩に至るまでの日数と、入院時の羊水中 IL-8 および IL-6 値の相関係数は、それぞれ 0.26 ($p=0.006$), 0.28 ($p=0.0037$) と、有意な相関を認めたが、IL-1 β との間には相関を認めなかった。以上の結果から、炎症性サイトカインは早産における子宮収縮に関与し、とくに IL-1 β は早い妊娠週数の早産に大きく関与している可能性が示唆された。また羊水中の IL-8 値や IL-6 値は、切迫早産の予後を評価するのに有用であると思われた。

S-24. 妊娠中期における子宮頸管長短縮症例の臨床的意義と早産治療効果

福岡大病院総合周産期母子医療センター¹, 福岡大学医学部産婦人科学教室²

吉里 俊幸¹, 井上 善仁², 瓦林 達比古²

[目的] 妊娠中期における子宮頸管長 (CL) 短縮の臨床的意義と ritodrine による子宮収縮抑制効果を評価することである。[方法] I. 経膈超音波断層法で経時的に CL を計測した単胎 114 例で、妊娠 26 週以前, 27-31 週に CL < 25 mm となった症例を各々早期短縮群 (20 例), 後期短縮群 (19 例), それ以外を対照群 (75 例) に分け、各群の臨床的背景の違いを検討した。114 例中自然経膈分娩に至った 78 例につき、分娩経過を頸管開大 5 cm から全開大までの開大速度として定量化し、3 群間で比較した。II. 頸管縫縮術未施行, 31 週以前で CL < 25 mm となり, ritodrine 単独による切迫早産治療を行った 43 例を対象に, ritodrine 投与中に陣痛発来した無効群 (15 例), ritodrine 投与終了 3 日以内に陣痛発来した早期陣痛発来群 (13 例), 陣痛発来しなかった未発来群 (15 例) の 3 群に分け、投与前後の CL を 3 群間で比較した。III. β_2 -stimulant 有効性の個体差を検討するため、妊娠満期で選択的帝王切開分娩時に採取した子宮筋切片を用い、isoproteloneol による子宮収縮抑制 (tocolysis) 作用を isometric tension 法によって定量的評価を行い、³H] dihydroalprenolol binding との相関を検討した。[成績] I. (1) 早期短縮群は全例、縫縮術 and/or tocolysis を要し、後期短縮群は 10 例 (52.6%) に tocolysis を施行した。(2) 早期, 後期短縮群は各 1 例が早産となった。(3) 頸管開大速度は、早期, 後期短縮群では対照群に比べ急速であった ($P < 0.05$)。II. (1) 投与前の CL は 3 群間で有意差はなかった。(2) 無効群および早期発来群では、投与終了時の CL は投与前より短縮した ($P < 0.05$)。III. Isoproterenol の子宮筋収縮抑制効果は個体差が大きく、抑制効果と ³H] dihydroalprenolol binding との間に相関関係を認めた。[結論] 妊娠中期に頸管長短縮を来たす症例においては、個体が有する子宮頸管特性と β_2 -受容体特性をはじめとする子宮筋収縮抑制効果の少なくとも 2 つの相加ないし相乗効果の結果が早産の有無に反映されることが示唆された。

シンポジウム 6 過活動膀胱

S-25. 難治性過活動膀胱に対する A 型ボツリヌス神経毒素を用いた治療の現状と展望

川崎医科大学泌尿器科¹, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学²

横山 光彦¹, 原 綾英¹, 近藤 典生¹, 藤井 智浩¹, 常 義政¹, 宮地 禎幸¹,
永井 敦¹, 渡辺 豊彦², 公文 裕巳²

【目的】難治性の過活動膀胱に対する A 型ボツリヌス毒素膀胱壁内注入療法は、欧米を中心に多数報告が見られるようになった。しかしながら本邦での実施施設は限られており、普及するには至っていない。今回我々の治療成績を報告し、将来展望について言及する。【対象と方法】岡山大学医学部および川崎医科大学倫理委員会の承認の後、2004 年 11 月から 2007 年 3 月までに 22 例の排尿筋過活動に伴う難治性尿失禁患者に治療を行った。10 例が特発性排尿筋過活動(男性 5 名, 女性 5 名, 年齢 52~80 歳, 中央値 68 歳)12 例が神経因性排尿筋過活動(男性 9 名, 女性 3 名 20~71 歳, 中央値 34 歳)であった。治療前に自己導尿による排尿管理が 10 例, 自排尿を行っていた患者が 12 例であった。投与方法は、原則として局所麻酔下で膀胱鏡を用い、23G あるいは 27G ディスポーザブル針で注入を行った。自排尿の患者では 50~100 単位, CIC 患者では 200 単位を注入した。治療前, 治療 1ヶ月後に CMG を施行し, 治療前, 治療 7 日, 1ヶ月後, 3ヶ月後に排尿日誌による効果の確認を行った。【成績】特発性では 10 名中 9 名で自覚的に尿失禁の改善を認め, 神経因性では 12 例中 10 例で自覚的な改善が認められた。CMG 上, 膀胱容量は有意な増加を認め, UIC 時の最大膀胱排尿筋圧も有意に低下した。効果持続は 3ヶ月~12ヶ月, 中央値 6ヶ月であった。現時点で再発後 9 名に再注入を行った。有害事象として自排尿を行っていた 12 例中 2 例で注入 1 週後に不完全尿閉となり一時的に CIC が必要であったが, その他は特に有害事象は認めなかった。【結論】A 型ボツリヌス神経毒素膀胱壁内注入療法は難治性過活動膀胱患者に対する有効な治療になると考えられたが, 自排尿を行っている患者では治療後に排尿困難が発生する可能性があり注意を要する。また再発後の頻回投与による治療効果の減弱も指摘されており, 今後さらなる検討を要するものと思われる。

S-26. 膀胱内アセチルコリン受容体刺激の蓄尿期に及ぼす影響

東京医科歯科大学医学部泌尿器科

増田 均

【目的】ニコチン, ムスカリン両受容体が尿路上皮, 中枢神経系に発現している事から, 両受容体が排尿の求心路に機能的役割を果たしている事が推定される。我々は末梢の両受容体の刺激が排尿反射に与える影響について比較検討した。(方法) SD 雌ラットを用い, ウレタン麻酔下で膀胱内圧測定を施行。アセチルコリン, ニコチン, ムスカリン受容体刺激剤のニコチン, arecaidine を経尿道的に投与し, 投与前後の排尿間隔及び各圧パラメーターの比較を行った。また, 膀胱壁にファストブルーを投与し, L6~S1 の後根神経節から同陽性細胞を単離し, その中でカプサイシン感受性細胞に対するアセチルコリン, ニコチン, arecaidine の反応をパッチクランプ法を用いて検討した。(結果)アセチルコリン(10~100 mM)の膀胱内灌流は, 排尿間隔を濃度依存性に短縮し, この変化は atropine sulfate (ATR, 30 μ M)の同時灌流では抑制されたが, ニコチン受容体拮抗剤である mecamlamine (MEC, 3 mM)の同時灌流では影響を受けなかった。arecaidine (1~30 μ M)及びニコチン(1~10 mM)の膀胱内灌流は, それぞれ排尿間隔を濃度依存性に短縮し, この変化はそれぞれ ATR 及び MEC の同時灌流で抑制された。カプサイシン前投与による C 繊維の脱感作は, ニコチンによる膀胱刺激症状は抑制したが, アセチルコリン, arecaidine によるそれには影響を与えなかった。パッチクランプ法で, アセチルコリン, ニコチンはカプサイシン感受性細胞で内向き電流を惹起するが, arecaidine は影響を与えなかった。(結論)膀胱におけるニコチン, ムスカリン受容体の興奮はともに排尿反射を促進し, 頻尿を誘発すると考えられた。前者は, カプサイシン感受性の C 繊維を介しており, 後者はカプサイシン抵抗性の求心性繊維又は筋肉の興奮を介するものと思われた。上記のメカニズムは抗コリン剤の蓄尿期評価システムの検討に有用と思われた。

S-27. 過活動膀胱における Kit 陽性細胞の役割

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

窪田 泰江, 小島 祥敬, 佐々木 昌一, 郡 健二郎

【目的】消化管の自動運動は、Kit (受容体型チロシンキナーゼ) 陽性細胞であるカハールの介在細胞によると考えられている。最近膀胱にも Kit 陽性細胞の存在が明らかになったことから、私たちは過活動膀胱 (OAB) の発症に Kit 陽性細胞が関与しているものと考え、膀胱における Kit 遺伝子 (c-kit) の意義について検討した。【対象・方法】約 400 g のメスモルモットを用い、OAB モデルとして排尿可能な程度の尿流出路閉塞 (Bladder outlet obstruction: BOO) 膀胱を作成した。術後 2 週目に以下の項目につき検討した。(1) 排尿回数および一回排尿量の変化。(2) 膀胱内圧測定。(3) 抗 c-kit 抗体を用いた免疫組織化学染色による Kit 陽性細胞の発現。(4) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による膀胱微細構造の変化の観察。【結果】(1) BOO 群では対照群に比べて有意に頻尿となり、1 回排尿量も減少していた。(2) 膀胱内圧測定では排尿前収縮が高頻度に観察された。(3) Kit 陽性細胞は BOO 群において筋層の平滑筋線維束周囲のみならず、肥厚した粘膜下層でも増加していた。(4) 微細構造は、正常膀胱で Kit 陽性細胞が互いに連絡し、筋細胞や神経と密接している像を観察した。BOO 群では Kit 陽性細胞が一部変形し、細胞内小器官が崩壊している所見もみられた。【考察・結論】以上の結果から、尿路上皮から求心性知覚神経へのシグナル伝達には、粘膜下層に存在する Kit 陽性細胞が関与していると考えられた。粘膜下層および筋層における kit 陽性細胞が、過活動膀胱の発症機序に関与していることが示唆され、今後 kit を標的とした新しい治療薬の開発につながる可能性があると思われる。

S-28. 膀胱血流の見地から見た膀胱平滑筋細胞の形態学的 phenotype の変化

近畿大学医学部泌尿器科

松本 成史

膀胱平滑筋の肥厚や線維化のメカニズムの解明は、前立腺肥大症を代表とする様々な下部尿路閉塞 (Bladder outlet obstruction; BOO) 性疾患に対する治療へと結び付く重要な要素である。膀胱血流の見地からこの変化を考えた場合、軽度～中等度の膀胱血流の変化では、尿路上皮や壁内神経が変性し、排尿筋過活動 (Detrusor overactivity; DO) の状態を呈しやすく、いわゆる過活動膀胱 (Overactive Bladder; OAB) 的な蓄尿障害が主に顕在化する。高度の膀胱血流の変化やその状態の長期化では、尿路上皮や壁内神経の障害が進行するだけでなく、膀胱虚血・再灌流による組織障害も加わり、膀胱平滑筋収縮力が低下し、低活動膀胱 (Underactive Bladder) や膀胱機能障害に陥り、様々な蓄尿症状や排尿症状を呈すると思われる。われわれは、ラット BOO モデルや膀胱虚血・再灌流 (Ischemia-Reperfusion; I/R) モデルに伴う膀胱平滑筋細胞の形態学的変化を、血管平滑筋細胞において形態学的に分類されている収縮型・合成型 phenotype という概念を用い、透過型電子顕微鏡にて検討してきた。また、ヒト摘出病的膀胱においても同様に検討した。BOO モデルでの経時的変化では膀胱平滑筋細胞の phenotype の比率は、BOO 群で 6 週までは非収縮型/収縮 (合成) 型 (non-contraction/contractile; nc/c) 比はほぼ一定で、その後は非収縮型が増加しており、20 週では nc/c 比は 3.2 倍であった。I/R モデルでは、1 時間虚血・4 時間再灌流群で nc/c 比は約 5 倍であった。ヒト摘出膀胱においても神経因性膀胱群で nc/c 比で高値を示した。以上の結果より、膀胱平滑筋細胞においても phenotype の概念が存在し、BOO や I/R により膀胱平滑筋細胞は形質変換し、非収縮型の比率が増加していた。膀胱機能低下には合成型 phenotype が重要な役割を果たしていると考えられ、OAB では、尿路上皮の関与が重要な因子と言われているが、膀胱平滑筋細胞の変化も関与している可能性がある。

S-29. 過活動膀胱における尿中 Prostaglandin E2 の定量および COX2 inhibitor の臨床的効果

奈良県立医科大学医学部泌尿器科

鳥本 一匡, 平山 暁秀, 松本 吉弘, 松吉 ひろ子, 藤本 清秀, 平尾 佳彦

【目的】高齢者における蓄尿症状は、QOL を著しく低下させる病態の一つである。蓄尿症状の主たる病態は、過活動膀胱であると考えられている。過活動性膀胱における排尿反射経路として、c-fiber を求心路とした反射経路が存在する。c-fiber は prostaglandin (PG) の存在下で活性化し、動物実験では、下部尿路閉塞による排尿筋虚血により VEGF の活性化および COX2 の mRNA およびタンパクの増加が報告されている。COX2 が活性化されることで PG 産生が増加し、過活動膀胱が生じている可能性がある。そこで今回、膀胱水力学検査 (pressure flow study; PFS) および膀胱冷水試験 (ice water test; IWT) の結果と尿中の PGE2 の定量より、過活動性膀胱における PG の関与について検討し、COX2 inhibitor の臨床効果を検討した。【方法】PFS および IWT を試行した 32 例を対象とし、PFS および IWT 試行後の尿および自尿中の PGE2 の定量を行った。次に蓄尿症状を有する患者 22 人に対し、COX2 inhibitor を 1ヶ月間投与し治療効果を評価した。評価法は患者自己申告とし 1. 効果あり (継続投薬を望む)、2. やや効果あり (他剤への変更は望まない) 3. 効果なし (他剤への変更は望む) にて判定した。なお、PFS において、下部尿道閉塞度 (BOO) を求めた。【結果】症例は、PFS および IWT の結果より a: BOO なし、かつ IWT 陰性、7 例 b: BOO なし、かつ IWT 陽性、5 例 c: BOO あり、かつ IWT 陰性、12 例 d: BOO あり、かつ IWT 陽性 8 例の 4 群に分類された。自尿および PFS 時尿では PGE2 の濃度は各群間で差は認めなかったが、IWT 時尿において、d 群の PGE2 が有意に高かった。COX2 inhibitor は、神経因性膀胱患者の蓄尿症状には無効であったが、前立腺肥大症患者に対しては有効であった。【結語】BOO を有する症例においては PGE2 産生増加により、c-fiber が活性化され過活動膀胱を生じている可能性が示唆された。また COX2 inhibitor は BOO を有する症例の蓄尿症状に対して有効であることが示唆された。

シンポジウム7 血管平滑筋研究の新展開

S-30. 大動脈壁内平滑筋細胞のバイオメカニクス：新鮮単離細胞の力学特性計測と血管壁内力学環境の推定

名古屋工業大学機械工学科

松本 健郎, 成田 健吾, 長山 和亮

【目的】高血圧による壁肥厚や、血流量増加による径拡大など血管壁のリモデリングは平滑筋により生じる。リモデリングの詳細を解明するには、血管壁内の細胞にどのような力が加わっているのか明らかにする必要がある。血管壁は力学的に不均質であるため、血管壁を均質とした従来の解析結果は不十分である。そこで本研究では平滑筋細胞の力学特性とこの細胞が壁内で置かれている力学環境を明らかにすることを目的とする。【方法】ブタ胸大動脈を対象とした。まず、組織内に存在する平滑筋細胞がどのような変形状態にあるのかを知るために、細胞核を染色し、組織中の細胞核の形状と酵素法により組織から単離された細胞の核形状を比較した。また、我々が開発した細胞用引張試験機を用い、組織から単離した平滑筋に加えた張力と細胞長、細胞核長の関係を求めた。これらの結果を基に細胞核長が組織内の長さで等しい時の張力から無負荷状態の組織内の細胞に加わっている応力を推定した。また、実際のブタ胸大動脈の内圧-外径関係より生理状態の血管壁の壁内ひずみ分布を計算し、引張試験の結果と組み合わせることで、生理状態の血管壁内の平滑筋細胞に加わる力を求めた。【結果】組織内の細胞核は単離細胞の核と比べて15%程度伸張されていることが判った。これより、細胞質全体は23%程度伸張されており、この際、細胞に加わる応力は13 kPa程度であるという結果が得られた。また、生理状態で拡張期圧(ブタの場合100 mmHg程度)が作用した血管壁には25%程度のひずみと100 kPa程度の応力が加わっており、その増分弾性係数は500 kPa程度であるのに対し、平滑筋細胞には53%程度のひずみと38 kPa程度の応力が加わっており、増分弾性係数は53 kPa程度であるという結果が得られた。【結論】血管壁全体と壁内細胞の力学環境は大きく異なることが判った。

S-31. 平滑筋細胞の牽引力計測と骨格構造の力学的役割

東北大学大学院工学研究科バイオロボティクス専攻

大橋 俊朗, 亀田 憲史, 佐藤 正明

接着細胞は焦点接着斑と細胞外マトリックスの結合によって接着している。このとき細胞は基質を細胞中心方向に引っ張る牽引力を発生している。したがって、細胞内の力学環境と細胞の機能に密接な関係があることを考えると、これらの力を測定することは細胞の生理・病理を理解する上で重要である。そこで本研究では、微細加工技術を用いてマイクロピラーを有する細胞培養基質膜を製作し平滑筋細胞の牽引力を計測することを目的とする。さらに細胞骨格の力学的役割について検討を行う。細胞培養基質膜は微細加工により形成したシリコンウェハを型としてPDMSで型取りをすることによって製作した。試料としてウシ大動脈由来平滑筋細胞を用いた。細胞培養後、マイクロピラーのたわみ量とマイクロピラーのバネ定数から牽引力を算出した。また、微小管および中間径フィラメントをノコダゾールおよびアクリルアミド投与により破壊し牽引力の変化およびアクチンフィラメント像を観察した。製作したマイクロピラーのサイズはおよそ直径 $3\mu\text{m}$ 、高さ $10\mu\text{m}$ 、中心間距離 $8\mu\text{m}$ であった。細胞を培養した結果、牽引力の平均値は 11.8 nN であり細胞周辺部において牽引力は大きい傾向が見られた。また、牽引力の方向とストレスファイバの分布には相関が見られた。微小管を破壊すると牽引力の方向は変化せずその値は平均で 3.3 nN 増加した。微小管の破壊前後でアクチンフィラメントの分布に大きな変化は見られなかった。一方、中間径フィラメントを破壊すると一旦牽引力は増加し、その後次第に低下していくことが示された。牽引力の低下時にはアクチンフィラメントの減少が観察された。以上の結果から、牽引力の主な発生源はストレスファイバであることが考えられ、微小管や中間径フィラメントはストレスファイバの分布あるいはその収縮機構に影響を及ぼしていることが示唆された。

S-32. 特発性肺動脈高血圧症患者の肺動脈平滑筋細胞における力学特性ならびに増殖能の検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科循環器内科¹,
 国立病院機構岡山医療センター循環器科², 奈良県立医科大学生理学第二講座³,
 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腫瘍・胸部外科⁴

中村 一文¹, 松原 弘己², 清水 壽一郎³, 草野 研吾¹, 伊達 洋至⁴, 大江 透¹

【背景】特発性肺動脈高血圧症 (PAH) は原因不明の難治性疾患であり, その成因の解明が待たれている. 病理学的には内膜・中膜の肥厚と細胞の異常増殖が認められている. 今回, 肺移植時の摘出肺より分離培養した肺動脈平滑筋細胞の力学特性ならびに増殖能を検討した. 【方法と結果】1) 力学特性の検討: PAH 患者由来の肺動脈平滑筋細胞の弾性率を原子間力顕微鏡で測定したところ, 内在性血管拡張物質 (NO ならびに PGI₂) に対する細胞の弾性率の変化が減弱していた. 平滑筋細胞の力学特性が正常例と nano/micro オーダーで相違していることが示唆された. 2) 増殖能の検討: Thymidine の取り込みにて増殖能を評価したところ PAH の肺動脈平滑筋細胞においては BMPR2 遺伝子の変異の有無にかかわらず血小板由来成長因子 (PDGF)・血清・BMP-2&7 刺激による増殖能が正常株に比べて亢進していた. BMPR2 遺伝子異常のない例をさらに詳細にしらべたところ, BMPR type1B (ALK-6) 遺伝子の過剰発現を認めた. さらに ALK-6 を dominant negative ならびに siRNA にて抑制したところ, 増殖能 (DNA 合成能) が抑制された. 以上のように BMP system の異常が確認された. 3) 増殖抑制薬の検討: 現在臨床に使用されている薬剤にて増殖能の抑制を試みたところ, prednisolone, carvedilol, simvastatin が Thymidine の取り込みを抑制した. prednisolone は p27 蛋白の発現を増加させて, cell cycle を止めていた. 【結語】PAH 患者の肺動脈平滑筋細胞は弾性率ならびに増殖能に異常を認めた. 今後この異常を標的とした治療が有効であると考えられる.

S-33. カルシウムイオンによるカルシウム感受性増強作用—PI3-キナーゼクラス II アルファの関与

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理

多久和 陽

細胞膜脱分極や受容体作動性アゴニスト刺激により引き起こされる細胞内遊離 Ca 濃度の上昇は, 平滑筋収縮において必須の役割をはたしている. Ca 濃度の上昇はカルモジュリン依存性リン酸化酵素ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を活性化することにより, 20 kD ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化をひきおこし, 収縮を惹起する. 我々は, Ca が MLCK を活性化するのみならず, MLC を脱リン酸化するミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) を抑制することを見出した. 従来, 受容体作動性生理活性物質は G12/13 を介して Rho-Rho キナーゼを活性化することにより MLCP を抑制し, 効率よく MLC リン酸化及び収縮を引き起こすと理解されていたが, 新たに, 受容体を介さない Ca 依存的な Rho-Rho キナーゼ-MLCP 系の制御機構の存在が明らかとなった. この発見は, Ca による平滑筋収縮活性化機構に関する従来のドグマに変更を迫り, Ca による MLCK, MLCP 二重制御を示している. Ca による Rho 活性化のプロセスには, これまで高等動物における機能が不明であったホスホイノシチド 3-キナーゼクラス II アルファ酵素 (PI3K-C2 アルファ) が介在していることを見出した. すなわち Ca は PI3K-C2 アルファを介して Rho を活性化し, Rho キナーゼ依存的に MLCP の調節サブユニット MYPT1 及び MLCP 阻害蛋白 CPI-17 をリン酸化することにより MLCP を抑制する. Ca 依存的な Rho 活性化及び MLCP 抑制は, 細胞膜脱分極のみならず受容体作動性アゴニストによる血管平滑筋収縮においても, G12/13 依存性機構とともに関与する. この Ca-PI3K-C2 アルファ依存的な機序により, Ca は効率良く MLC リン酸化, 従って収縮をひきおこす (Ca-induced Ca sensitization).

S-34. SPC/Fyn/Rho-kinase 経路による血管平滑筋収縮の Ca^{2+} -sensitization への膜ラフトの関与と、これに対するエイコサペンタエン酸の抑制メカニズム

山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学¹,
独立行政法人科学技術振興機構 JST イノベーションプラザ広島²

岸 博子¹, 森景 則保¹, 加治屋 勝子¹, 川道 穂津美¹, 高田 雄一², 徐 丹¹,
郭 鳳玲¹, 王 晨¹, 松尾 さやか¹, 小林 誠¹

Rho-kinase (ROK) による血管平滑筋収縮の Ca^{2+} -sensitization は、血管収縮において重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、sphingosylphosphorylcholine (SPC) が Src ファミリーチロシンキナーゼの1つである Fyn の活性化を通して ROK による Ca^{2+} -sensitization を引き起こす事、更に、エイコサペンタエン酸 (EPA) が Ca^{2+} 依存性収縮には影響せずに、SPC による血管平滑筋の Ca^{2+} -sensitization を選択的に抑制する事を見出し報告してきた。今回我々は、SPC による血管平滑筋の Ca^{2+} -sensitization に対する EPA の抑制メカニズムについて検討した。SPC は、細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の上昇を伴う事なく、血管平滑筋収縮を起こし、EPA は、高カリウム脱分極による Ca^{2+} 依存性収縮には影響せずに、SPC 収縮を抑制した。培養血管平滑筋細胞において SPC 刺激により Fyn および ROK は形質膜へ移動し、膜ラフトのマーカーである caveolin-1 および cholera toxin subunit B と共局在した。EPA は caveolin-1 の局在に影響する事なく、SPC による Fyn と ROK の膜ラフトへの移動を抑制したが、 β -cyclodextrin は、形質膜から選択的にコレステロールと caveolin-1 を除去し、SPC による血管平滑筋収縮および Fyn と ROK の膜ラフトへの移動を抑制した。以上の結果から、SPC/Fyn/ROK 経路による血管平滑筋収縮の Ca^{2+} -sensitization において、膜ラフトは重要な役割を果たし、EPA は β -cyclodextrin と異なる機序で、この経路を阻害する事が示唆された。

S-35. 血管平滑筋と内皮細胞の相補的關係

名古屋市立大学看護学部生理¹, 名古屋市立大学医学部生理学²

山本 喜通^{1,2}, 鈴木 光²

血管内皮細胞が一酸化窒素やエンドセリンを放出して血管平滑筋の収縮弛緩に関与していることはよく知られている。そうした脈管作動物質を介する制御に加え、内皮細胞は平滑筋の細胞膜電位を変化させることによっても血管径の調節に関与していると考えられる。事実、内皮細胞と平滑筋細胞はギャップ結合で交通しており、膜電位を共有している。両細胞には各々異なった種類のイオンチャネルや受容体が分布し、それらが協同で共通の膜電位を保持している。例えば、静止状態では平滑筋の K^+ チャネルが主に開口して静止膜電位を形成し、内皮細胞のチャネルは余り開いていない。よって内皮細胞は、平滑筋細胞と切り離して単離すると通常の静止膜電位を維持できない。平滑筋細胞は電位依存性 Ca^{2+} チャネルを持ち、刺激により脱分極するとそれが開いて活動電位を発生する。その膜電位変化は内皮細胞に伝播し、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを持たない内皮細胞からも活動電位が記録できる。一方、内皮細胞はムスカリン受容体やプリン受容体を持ち、それらへの刺激で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。それによって脈管作動物質が放出されると同時に、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルや同 Cl^- チャネルが開き、各々膜を過分極ないし脱分極させ、それが平滑筋に伝播してその弛緩ないし収縮を起こす。この際過分極するか脱分極するかは静止膜電位の値に依存しており、収縮血管で見られる浅い静止膜電位では過分極して弛緩が、弛緩血管で見られる深い静止膜電位では脱分極して収縮が起きる傾向があり、一種の自動制御システムとして機能すると考えられる。

ワークショップ 平滑筋臓器における免疫・炎症に関わるプレイヤー達 —基礎から臨床まで

W-1. 気道平滑筋における H_2O_2 の作用

名古屋市立大学大学院医学研究科薬理学

渡邊 義将, 伊藤 猛雄

慢性気道炎症において、炎症細胞に由来する各種の活性酸素種が、病態形成・増悪因子として重要であることが以前より指摘されている。とくに H_2O_2 は、気管支喘息などの患者の呼気中での増加やその重症度との関連性が示唆され、その細胞傷害作用の気道炎症における役割が注目されている。しかし、これらの病態における気道平滑筋の機械的機能調節に対する H_2O_2 の作用についての知見は限られている。我々は、ウサギの気道平滑筋摘出標本を用い、その収縮機能に対する H_2O_2 の作用を検討した。上皮温存標本において、アセチルコリン (ACh, $3 \mu M$) は収縮を惹起し、 H_2O_2 ($10-100 \mu M$) は、濃度依存性にこれを抑制した。この H_2O_2 の作用に対し、カタラーゼを豊富に発現する上皮細胞層が防御的に働いている可能性があることが示唆され、上皮細胞が傷害されるような病態では、 H_2O_2 の平滑筋に対する弛緩作用が増強される可能性があると考えられた。一方、上皮除去標本において、 H_2O_2 は ACh による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を増強するにもかかわらず収縮を著明に抑制した。また、スキンド標本において、 H_2O_2 は、生理的と想定される濃度 ($0.3 \mu M$ 以下) の Ca^{2+} による収縮を、ACh の存在・非存在にかかわらず抑制した。よって、 H_2O_2 は、収縮タンパク系の Ca^{2+} -感受性を低下させることにより、ACh によるウサギ気道平滑筋収縮を抑制する可能性が示唆された。しかしながら、上記の Ca^{2+} 濃度範囲における収縮の大きさは、 $10 \mu M Ca^{2+}$ により惹起される最大収縮と比較して非常に小さいことも明らかとなった。したがって、本研究では、きわめて大きな収縮能の余地を残した生理的状态での ACh-収縮に対する H_2O_2 の作用をみているに過ぎない可能性がある。病的状態における収縮タンパク系の特性変化などの基本的情報が不足しており、慢性炎症時の気道の機械的的特性変化を明らかにするためには、今後、適切な病態モデルを用いて上記のような検討を行う必要がある。

W-2. 消化管壁にみられる骨髄由来細胞

久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門

中村 桂一郎

再生医療との関連において骨髄由来細胞が注目されている。我々は GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を野生型動物に移植したキメラ動物 (石川らが開発) の様々な末梢組織における GFP 陽性細胞を観察し、骨髄に由来する細胞が組織特異的な細胞学的特徴および分布様式を示すことを報告してきた。また、マクロファージや樹状細胞など生体防御系細胞のマーカー分子に対する抗体をもちいた免疫組織細胞学的観察では多くの GFP 陽性細胞がこれら抗体にも陽性であった。一方、消化管を含むいくつかの臓器で生体防御系以外の細胞への分化がみられた報告があり、我々も GFP 陽性の心筋や骨格筋細胞を観察している。今回、骨髄移植キメラ動物の消化管について、凍結切片および全載標本、また、細胞表面マーカーの免疫染色標本として通常の光顕、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡により観察し、消化管壁、特に筋層にみられる骨髄由来細胞について、大きさ、形、周囲の細胞・基質との関連など細胞学的形態情報の解析を試みた。その結果、小腸、大腸では粘膜固有層および上皮細胞間に突起をもたない円形ないし楕円型のリンパ球や形質細胞と考えられる GFP 陽性細胞が多数観察された。また、上皮基底側には粘膜固有層との境界面に沿って伸長する突起をもつ陽性細胞が認められ、myofibroblast との関係が示唆された。さらに筋層では、ICC や消化管運動コントロールとの関連で最近再評価されている組織常在型マクロファージ (resident macrophage) 様の細胞が観察された。今後、これらの細胞の分子細胞生物学的特性、周囲の組織・細胞との関連、動態、更新について解析が進むことにより、そのような形態的特徴が示す生体防御機構、組織の形態形成・維持、そして組織・臓器再生への関与についての医学生物学的意義が明らかになり、病態生理理解の一助となることが期待される。

W-3. 消化管炎症時の筋層部マクロファージ動態と機能

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室

堀 正敏, 尾崎 博

消化管筋層間には壁内神経叢とカハール介在細胞 (ICC) がネットワークを構成して消化管運動制御の中心的役割を果たしている。さらに、この筋層間には多数のマクロファージが常在していることが知られている。本ワークショップでは、腸炎発症時における消化管筋層部でのマクロファージ動態とその病態生理機能について概説する。ハプテンによる腸炎モデルラットを用いて筋層部におけるマクロファージの動態を経時的に解析すると、炎症初期には MCP-1 の一過性の増加に伴って、単球由来マクロファージの筋層部への浸潤が速やかに生じ、それに引きつづいて緩やかに常在型マクロファージの増加が認められた。MCP-1 中和抗体や MCP-1 のドミナントネガティブ体 (MCP-1 DN) を用いて MCP-1 の作用を阻害すると、単球由来マクロファージの減少だけでなく、常在型マクロファージの減少も認められた。また、炎症初期にはマクロファージの細胞分裂像が認められた。すなわち、炎症により筋層部に浸潤してきた単球由来のマクロファージの一部は、筋層部で常在型マクロファージへと形質を変化させること、また炎症初期にはマクロファージも増殖活性を持ち、筋層部のマクロファージ数増加に寄与することが示唆された。形態学的解析から炎症時には ICC や壁内神経叢のネットワークは障害を受けており、この神経障害部を取り囲むようにマクロファージの分布が認められた。また、マクロファージは COX-2 や iNOS などの炎症関連タンパク質を発現して活性化していた。この時、平滑筋の収縮能や蠕動運動は顕著に抑制されていた。また、MCP-1 中和抗体や MCP-1 DN の処置によって、炎症に伴う消化管平滑筋の収縮抑制は軽減した。以上の成績から、腸炎において筋層部のマクロファージは増加して活性化し、神経、ICC、ならびに平滑筋に作用し消化管運動機能障害に中心的な役割をはたすと考えられた。

W-4. 腸間膜マスト細胞—その発生・生存・活性化

神戸大学大学院医学系研究科病理学分野

伊藤 彰彦

マスト細胞は骨髄造血幹細胞の子孫で、全身の皮膚や消化管・気道粘膜、腸間膜、腹腔内などに生理的に存在する。マスト細胞の発生・分化機構を解析するための優れた道具として培養マスト細胞がある。これはマウスの骨髄細胞を IL-3 存在下に培養して得られる細胞集団で、マスト細胞欠損動物からも樹立可能で、移植可能である。bHLH-Zip 型転写因子 MITF (microphthalmia transcription factor) の遺伝子座には様々な変異アリルが存在し、そのホモマウスはいずれもマスト細胞欠損動物である。変異アリルの種類によって欠損の程度が異なるが、腸間膜及び腹腔マスト細胞の欠損は多くのアリルに共通した症状である。実際これらの変異マウス由来培養マスト細胞は腹腔内に移植しても腸間膜に生着しない。cDNA ライブラリー・サブトラクション法により、マスト細胞において MITF の転写標的となる接着分子 SgIGSF (別名、TSLC1, Necl2, SynCAM) を単離した。この分子を遺伝子導入又はトランスジェニックマウス作成により MITF 変異培養マスト細胞に発現させた所、部分的ながら腹腔内及び腸間膜での生着能が回復した。興味深いことに SgIGSF は神経にも発現し、ホモフィリックな結合様式を持つことから、この分子が神経とマスト細胞との接着を媒介する可能性が考えられた。この可能性は両者の共生培養系において証明され、さらに SgIGSF が媒介する接着は神経からマスト細胞への刺激伝達を促進することもわかった。皮膚や消化管粘膜ではマスト細胞はしばしば末梢神経と接している中で、SgIGSF は同様の働きを生体内でも担っているか調べた。腸間膜神経を電氣的に刺激すると野生型マウスの腸間膜マスト細胞は高頻度に脱顆粒したが、MITF 変異マウスでは脱顆粒の頻度は有意に低かった。以上の結果から、SgIGSF は腸間膜マスト細胞の発生・生存・活性化において重要な役割を果たしていると考えられた。

W-5. ヒト筋線維芽細胞株 CCD-18Co における TRP 蛋白質発現とその機能 —消化管炎症との関連

福岡大学医学部生理学

海 琳, 本田 啓, 井上 隆司

消化管の炎症・増殖異常には筋線維芽細胞から放出される活性物質が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、これに何らかの Ca^{2+} 動態の破綻が関与している可能性を探索するため、腸管由来筋線維芽細胞 CCD-18Co を用い、TRP 蛋白質の発現パターン・機能解析を行った。RT-PCR 法によって 12 種類の TRP チャンネルの転写産物が検出された。更にこれらの TRP isoform の活性化物質 (OAG, 低浸透圧, 2-APB, sphinganine 等) の投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が観察され、パッチクランプ法を用いた膜電流測定によってこれらの活性化物質による非特異的陽イオン電流の活性化が認められた。また、CCD-18Co に作用する炎症性サイトカイン $TNF\alpha$ の投与によって、細胞内 Ca^{2+} が上昇し、TRPC あるいは TRPV サブファミリーの特徴を示す電流が記録された。 $TNF\alpha$ (100 ng/ml) 24 時間インキュベーションにより CCD-18Co における PGE2 産生が促進され、これに平行して TRPC1 のタンパク発現が増加し、持続的およびストア枯渇活性化 Ca^{2+} 流入が増大した。この PGE2 産生の促進は細胞内外の Ca^{2+} 濃度緩衝作用や Indomethacin, Dexamethasone の同時投与によって抑制された。これらの結果から、 $TNF\alpha$ と、CCD-18Co 細胞における Ca^{2+} 動員の増強と、炎症メディエーター PGE2 の産生との間には密接な関係があり、これには TRP 蛋白質が関与していることが示唆された。

W-6. 炎症性腸疾患 (IBD) における平滑筋の関わり

奈良県立医科大学中央内視鏡・超音波部¹, 奈良県立医科大学消化器・総合外科²

藤井 久男¹, 小山 文一², 向川 智英², 中川 正², 内本 和晃², 大槻 憲一²,
中村 信治², 中島 祥介²

炎症性腸疾患 (IBD) —潰瘍性大腸炎 (UC) とクローン病 (CD) は、欧米先進国に多い疾患であるが、わが国においても近年患者数が増加の一途を辿っている。本疾患は将来を担う若年者に好発し、再燃緩解を繰り返し慢性的に経過するため、社会的にも問題となる疾患である。病因については、環境因子といくつかの疾患感受性遺伝子の関与が推定されているものの未だ解明に至っていない。しかし、粘膜免疫学の進歩により本疾患は腸管における免疫応答の異常が病態の中心であることが分かってきた。治療に関しては、5-amino-salicylic acid (5-ASA) 製剤、免疫調整剤に加え、最近抗 $TNF-\alpha$ 抗体の登場を嚆矢として生物学的製剤の開発が急速に進んでいる。また UC においては、内科治療困難例に対し大腸全摘・回腸囊肛門(管)吻合術が標準的術式として一定の成績を挙げている。このように本疾患の病因解明や治療における進歩に対し、主要症状である排便異常や外科手術後の排便機能障害についての病態解明はほとんど進んでいない。消化管の平滑筋に対して基礎的研究が進み、知見は急速に増えつつあるが、臨床における課題とのギャップが大きい。臨床における腸管運動、排便機能検査は非透過性マーカー服用による transit time 測定や腸管内圧測定など古典的であり限られている。われわれは、^{99m}Tc を用いた大腸シンチグラムにより、潰瘍性大腸炎の緩解期における大腸内容移送運動の評価を試みたが、このような試みは臨床研究レベルで留まっている。炎症を抑制するとともに、頻便、下痢、失禁などの症状が緩和できれば患者の QOL が向上して社会復帰が完全なものとなる。そのため、基礎研究の成果を臨床に応用できるよう基礎と臨床の融合を図らなければならない。

Young Investigators Award

Y-1. ピオグリタゾンによる人冠動脈平滑筋細胞の増殖，遊走抑制効果の検討

岡山大学大学院医歯学総合研究科循環器内科

吉川 昌樹，中村 一文，長瀬 聡，桜木 悟，草野 研吾，大江 透

【背景】動脈硬化の進展や特に冠動脈形成術後の新生内膜増殖において平滑筋細胞の遊走，増殖は重要な役割を演じると言われている。糖尿病の患者においては冠動脈形成術後の再狭窄率が高い。糖尿病の治療薬としてインシュリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体が有り動物の平滑筋細胞において様々な効果が報告されているが人冠動脈平滑筋細胞においては殆ど無い。今回我々は，アンジオテンシン II もしくは platelet-derived growth factor (PDGF) による人冠動脈平滑筋細胞の遊走，増殖効果，活性酸素の発生をピオグリタゾンが抑制しうるかどうかを検討した。【方法と結果】アンジオテンシン II および PDGF を細胞増殖，遊走刺激因子として使用した(アンジオテンシン II は増殖効果を認めなかった)。遊走は migration assay を使用し顕微鏡にて測定した。アンジオテンシン II による遊走効果はピオグリタゾン (1, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) によって容量依存的に抑制された ($P < 0.01$)。PDGF による遊走効果もピオグリタゾン (1, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) によって容量依存的に抑制された ($P < 0.01$)。増殖はトリチウムでラベルしたチミジンの取り込みによる DNA 合成として測定した。PDGF による増殖効果はピオグリタゾン (1, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) によって容量依存的に抑制された ($P < 0.01$)。活性酸素の発生は DCFH-DA の蛍光を蛍光顕微鏡にて測定した。アンジオテンシン II による活性酸素の発生はピオグリタゾン (0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$) によって容量依存的に抑制された ($P < 0.01$)。また PDGF による活性酸素の発生もピオグリタゾン (0.1 and 1 $\mu\text{mol/L}$) によって容量依存的に抑制された ($P < 0.01$)。【結語】人平滑筋細胞においてピオグリタゾンはアンジオテンシン II および PDGF による遊走と PDGF による増殖を容量依存的に抑制した。またアンジオテンシン II および PDGF による活性酸素の発生を容量依存的に抑制した。

Y-2. 2型糖尿病ラット腸間膜動脈における内皮由来因子の不均衡性

星薬大医薬研機能形態

松本 貴之，各務 実花，小林 恒雄，鎌田 勝雄

我々は，2型糖尿病 (OLETF) ラットを用い，血管反応性異常を検討してきた (Br. J. Pharmacol. 149: 931-41, 2006; Eur. J. Pharmacol. 538: 132-40, 2006; Atherosclerosis, in press, 2007)。血管緊張性調節において内皮由来弛緩 (EDRF)・収縮 (EDCF) 因子が重要であるので腸間膜動脈を用いて検討した。60~65 週齢 OLETF・LETO (対照) ラットを用い，腸間膜動脈における ACh 誘発弛緩反応，NOS 阻害薬 (L-NNA) 存在下での収縮反応・蛋白発現・prostanoid 産生，血中パラメータを検討した。OLETF 群にて，adiponectin 値は低下し，体重，glucose・cholesterol・triglyceride 値，血圧は増加していた。ACh 誘発弛緩反応は減弱し，indomethacin (indo) 処置で弛緩反応が増大したが，この条件下でも OLETF 群で減弱していた。OLETF 群にて ACh 誘発 NO 弛緩反応 (indo, ChTX, apamin 処置) は減弱傾向にあり，EDHF 弛緩反応 (L-NNA, indo 処置) は減弱していたが，ACh 誘発収縮反応は増大し，これは，COX 阻害で抑制された。ACh 刺激による PGE₂，TXA₂ 産生，及び COX-1，COX-2 蛋白発現が OLETF 群で増大していたが，phospho-eNOS (Ser1177) 発現は減少していた。高齢 2型糖尿病動物は高血糖，高血圧，高 cholesterol を呈し，腸間膜動脈における内皮機能障害が認められた。これには，弛緩因子の NO 及び EDHF signal の減弱と EDCF の過剰産生が関与し，これら内皮由来因子の不均衡性の是正が，2型糖尿病血管合併症の進展抑止に繋がると考えられる。

Y-3. マウス遠位結腸の弛緩に関わる抑制性神経伝達物質

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用薬理学教室

日高 彩子, 中嶋 秀満, 東 泰孝, 竹内 正吉

【目的】これまで我々は、ラット結腸においてVIPとPACAPが弛緩に関与していることを報告した。今回、マウス遠位結腸でのNANC性弛緩の神経伝達物質及びその細胞内機序を検討した。【方法】雄性C57BL/6Jマウスから遠位結腸を採取し、 $1\mu\text{M}$ atropine, $5\mu\text{M}$ guanetidine存在下において経壁電気刺激(EFS; 0.5 msec, 10 Hz, 30 V, 100 pulses)による縦走筋方向の運動を記録した。【結果】(1) EFSによる弛緩はNO合成酵素阻害薬のL-NNAにより約40%抑制され、またHeme oxygenase阻害薬であるSnPP-9により約30%抑制された。両阻害薬の併用によって約70%抑制された。(2) soluble Guanylate Cyclase(sGC)阻害薬であるODQは濃度依存性にEFSによる弛緩を抑制し、 $10\mu\text{M}$ では約70%抑制した。NO供与体であるNOR-1による弛緩はODQの処置により有意に抑制された。CO供与体であるCORMによる弛緩もODQの処置により有意に抑制された。(3) cGMP-dependent protein kinase (PKG)阻害薬であるKT 5823はEFSによる弛緩を濃度依存性に抑制した。KT 5823存在下で残った弛緩はSnPP-9処置により全く影響を受けず、L-NNAにより更に抑制された。NOR-1による弛緩はKT 5823処置の影響を受けなかったが、CORMによる弛緩は有意に抑制された。(4) EFSによる弛緩はapaminにより約40%抑制された。Apamin存在下で残った弛緩は、SnPP-9により全く影響を受けず、L-NNAによって更に抑制された。ApaminはCORMによる弛緩を有意に抑制したが、NOR-1による弛緩には影響しなかった。【考察】マウス遠位結腸におけるNANC性弛緩にNOとCOが独立したメディエーターとして機能しており、両者共にsGCを介して弛緩反応を生じていることが明らかとなった。また、COを介した弛緩にPKGとSKチャンネルの活性化が関与していることが示唆された。

Y-4. マウス膀胱括約筋でのムスカリン受容体活性化による弛緩機構

大阪府立大院生命環境獣医応用薬理¹, Dpt. Physiol., Dartmouth Med. Sch.²

河崎 哲也¹, 中嶋 秀満¹, 東 泰孝¹, 松井 稔², 竹内 正吉¹

排尿時における膀胱括約筋の弛緩にムスカリン受容体(MR)が関与していることは示されているが、その弛緩機構はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、マウス膀胱括約筋標本を用いてMRを介した弛緩機構について検討した。【方法】Wild-typeおよびMR欠損(M-KO)マウスから膀胱括約筋標本(0.8 mm×2.0 mm)を作製した。標本を、Tyrode液を満たしたorgan bathに装着し、bath中に適用したcarbachol (CCh)による弛緩反応を等尺性に記録した。【結果】1) Wild-typeおよびM-KO標本において、静止レベルではいずれもCChには反応しなかったが、noradrenaline (NA)により収縮が生じた。2) Wild-type標本においてNAによる収縮張力が一定となった後にCChを処置すると濃度依存性に弛緩反応が生じた。この弛緩反応はatropineにより抑制された。3) CChによる弛緩反応は、Wild-type標本と比較して、M₂-KO標本では同程度であったが、M₃-KO標本においては著しく減少した。4) Wild-type標本においてCChによる弛緩反応はtetrodotoxinによる影響を受けなかったが、NO合成酵素阻害薬であるL-NNAにより一部抑制された。NO供与体であるNOR-1は濃度依存性の弛緩を生じた。5) Wild-type標本においてATP処置により濃度依存性の弛緩が生じ、この弛緩反応はP2Y₁受容体antagonistであるadenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulphate (A3P5PS)により抑制された。さらに、A3P5PSはCChによる弛緩反応も抑制した。【考察】M-KOマウス膀胱括約筋標本を用いた実験結果より、弛緩に関与する受容体はM₃R subtypeであることが明らかとなった。また、M₃Rの活性化による弛緩にはNOとATP-P2Y₁受容体系が関与していることが示唆された。

Y-5. 高インスリン血症によって誘発される血圧, ET-1 収縮増加に関する血中 Ang II と糖尿病の影響

星薬科大学医薬研機能形態

小林 恒雄, 田口 久美子, 松本 貴之, 鎌田 勝雄

糖尿病時において, 血糖コントロールを目的としたインスリン慢性投与は, 高インスリン血症を生じ, 血管合併症や高血圧を誘発する可能性が知られている. そこで今回, 糖尿病モデルを用いた血中インスリン値の増加と血管収縮増加における angiotensin II (Ang II), endothelin-1 (ET-1) の因果関係, 更に ET-1 収縮異常における作用機序について検討を行った. 雄性 Wistar 系ラット (Control) 及び糖尿病ラット (STZ, 65 mg/kg) に, インスリン (13.3 U-66.6 U/kg/day, s.c.), インスリン+losartan (Ang II type1 receptor antagonist, 25 mg/kg/day, p.o.), インスリン+J104132 (ET receptor antagonist 10 mg/kg/day, p.o.), Ang II (288 μ g/kg/day, s.c.) を 2 週間慢性投与し, 摘出胸部大動脈における血管反応, Western blot, 免疫染色を行った. インスリン投与は, 両群とも無処置群と比べ血中インスリン, Ang II, ET-1 値の増加が認められた. インスリン投与糖尿病群は, 血圧, ET-1 による収縮反応の増強が認められるが, インスリン投与 control 群において影響は認められなかった. ET-1 収縮の増加は, PI3-Kinase, MEK/ERK inhibitor 処置によって, control 群と同程度に抑制された. losartan 投与は, 血圧, ET-1 収縮の異常を改善したが, J104132 群は, 血圧の改善は認められるが, ET-1 収縮異常に改善効果は認められなかった. Ang II 投与は, 糖尿病群において ET-1 収縮の増加が認められた. Western blot によって, インスリン投与糖尿病群の ET-1 受容体の増加, ERK の活性化が認められ, この異常は losartan の慢性投与によって改善した. 以上の結果から, インスリン投与糖尿病時は, Ang II, ET-1 値の増加を誘発し, ET-1 受容体の増加, PI3-K, ERK の活性化を介し, 血圧, ET-1 収縮増加を生じることが示唆された. 更に, Ang II type1 receptor antagonist の慢性投与は, 血圧, ET-1 受容体, ET-1 収縮増加を改善することが示唆された.

Y-6. $\alpha 1$ アドレナリン受容体欠損マウスの雄性生殖機能

国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部¹, 東邦大学薬学部薬理学教室²,
京都大学大学院薬学研究科ゲノム創薬科学分野³

三部 篤¹, 田中 芳夫², 藤原 葉子¹, 津村 秀樹¹, 山内 淳司¹, 小池 勝男²,
辻本 豪三³, 田上 昭人¹

(目的) $\alpha 1$ アドレナリン受容体 ($\alpha 1$ 受容体) 拮抗薬は, 前立腺肥大症に伴う排尿困難症を軽減させる治療薬として広く用いられている. $\alpha 1$ 受容体拮抗薬の副作用の一つに, 射精障害が報告されているが, $\alpha 1$ 受容体の射精に対する役割を分子レベルで解析した報告は殆ど無い. 本研究では, $\alpha 1$ 受容体欠損マウス ($\alpha 1A$ 受容体欠損マウスおよび $\alpha 1A, B, D$ 受容体三重欠損マウス) を用いて, 射精への $\alpha 1$ 受容体の関わりを解析した. (結果) $\alpha 1A$ 受容体欠損マウスの交配成功率は野生型マウスの 50% に低下した. この交配能低下は, $\alpha 1A, B, D$ 受容体三重欠損マウスで著しく亢進した. 交配能低下と同様に, 交配時の雄の射精精子数は, $\alpha 1A$ 受容体欠損マウスで著しく低下し, $\alpha 1A, B, D$ 受容体三重欠損マウスでは殆ど消失していた. 精管のアドレナリンに対する収縮は, $\alpha 1A, B, D$ 受容体三重欠損マウスで完全に消失し, 電気刺激による収縮性も顕著に低下していた. (結論) これらの結果は, $\alpha 1$ 受容体, 特に $\alpha 1A$ 受容体が精管収縮, 射精機能および交配能に必須である事を意味する.

Y-7. 血管平滑筋細胞の静止時 Ca^{2+} 動態制御機構における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割

名古屋市立大学大学院薬学研究所細胞分子薬効解析学分野¹, 福岡大学医学部薬理学²

村田 秀道¹, 山村 寿男¹, 大矢 進¹, 岩本 隆宏², 今泉 祐治¹

【目的】 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) は, 主に細胞興奮時に上昇した細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ排出する役割を担うが, 特定条件下では輸送方向の逆転が生じ, 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇を招く. 平滑筋における NCX (NCX1) は発現量が少なく機能解析が困難であった. 平滑筋細胞において, 静止時に筋小胞体からのリアノジン受容体を介した自発的 Ca^{2+} 遊離 (Ca^{2+} スパーク) が生じ, 近傍の細胞膜上大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK) チャネルを活性化し, 自発一過性外向き電流 (STOCs) を発生させること, STOCs による過分極は Ca^{2+} チャネル活性を低下させ, 静止時血管緊張を減少方向に調節することが知られている. しかしこの機構での NCX 機能は明らかでない. 本研究では NCX1.3 を平滑筋特異的に高発現させた遺伝子改変マウス (NCX1.3 TG) を用い, 血管平滑筋 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 制御における NCX1 の寄与を解析した. 【方法】 7~12 週齢 NCX1.3 TG と同系統野生型マウス (WT) の胸部大動脈を用い, Ca^{2+} 動態関連タンパクの mRNA 及びタンパク発現量を Q-PCR 法, western blotting 法により検討した. 平滑筋細胞 (mASMCs) を単離し, 蛍光イメージング法により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を, whole cell patch-clamp 法により膜電流を解析した. 【成績】 NCX 1.3 TG の mASMCs において STOCs 発生頻度の有意な増加が見られた. さらに, NCX 選択的阻害薬の KB-R7943 投与により, 両群で発生頻度の有意な減少が見られた. L 型 Ca^{2+} チャネルや BK チャネルの蛋白発現量及び電流密度は両群で同程度であった. 従って NCX 1.3 TG における STOCs 増加は, NCX を介した Ca^{2+} 流入増加によると考えられた. 【結論】 血管平滑筋細胞において NCX は静止時における細胞内への Ca^{2+} 流入経路としても働き, STOCs 発生を介して静止膜電位を制御している可能性が示唆された.

Y-8. 生殖器平滑筋のテストステロンによる大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルとリアノジン受容体の発現変化

名古屋市立大学大学院薬学研究所

大野 晃稔, 大矢 進, 山村 寿男, 今泉 祐治

平滑筋細胞の筋張力は細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) によって調節されている. 細胞内ストア膜上の Ca^{2+} 放出チャネルであるリアノジン受容体 (RyR) は興奮時のみならず, 静止時においても自発的 Ca^{2+} 遊離による局所 Ca^{2+} 濃度上昇 (Ca^{2+} -spark) を発生させることにより, 近傍細胞膜上の大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネル (BK) を活性化し, 静止膜電位の維持に寄与している. 性機能を担う生殖器には平滑筋を含む組織が多く, なかでも精管平滑筋 (VDSM) は膜興奮性が高く BK が高発現している. テストステロン (TES) の生殖器に与える影響は大きく, 内分泌攪乱物質や抗アンドロゲン療法によって TES が低下すると生殖器の萎縮が生じる. しかし TES 低下による生殖器平滑筋におけるイオンチャネル発現変化についてほとんど解明されていない. 本研究では TES の VDSM における RyR と BK 発現への影響を検討した. 3 週齢の雄性 Rat に去勢術 (CAST) と擬似手術 (SHAM) を施した. また抗アンドロゲン薬であるフルタミド (FUL) を毎日経口投与し (100 mg/kg) (FUL), 対照群には FUL の溶媒であるゴマ油を投与した (50 ml/kg) (Vehicle). これらの 7 週齢 Rat より VDSM を摘出した. 単離 VDSM 細胞に Whole cell-Patch 法を適用し BK 電流の変化について検討した. また RyR 機能を検討するため Ca^{2+} -spark と Caffeine で惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を Ca^{2+} 画像解析法により検討した. Western-blotting 法を用いて Rat VDSM における RyR と BK チャネルタンパク発現変化を検討した. CAST において BK 電流密度は SHAM と比較して 70% 程減少し, この結果は BK α subunit タンパク質発現量の変化とほぼ一致していた. また FUL でも CAST 同様の変化が観察された. RyR タンパク量も有意に FLU 群で減少しており, Caffeine で惹起される $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇も Vehicle に比べ著しく減少していた. 更に FUL では Ca^{2+} -spark はほとんど観察されなかった. 以上より VDSM の RyR と BK の機能的発現が TES により強力に制御されていることが明らかとなった.

Y-9. マイクロパターン付き細胞培養ディッシュを用いた心筋細胞網の作成

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科循環器内科¹, 株式会社クラレくらしき研究所²,
株式会社クラレつくば研究所³

浦川 茂美¹, 中村 一文¹, 三浦 大志¹, 草野 研吾¹, 三浦 綾¹, 角田 和歌子¹,
大江 透¹, 西 泰治², 鶴田 仁志³, 田崎 剛³, 福田 始弘³

【背景】近年、培養心筋細胞を使ったシートが考案され、再生医療への応用が期待されている。今回マイクロパターンを持つ樹脂の上で心筋細胞を培養し、網状の細胞シート作成を試みた。【方法】新生児ウィスターラットから摘出した心筋細胞を、マイクロパターン付きディッシュ上に培養し、網状シートの作成を試みた。【結果】コマ撮り顕微鏡撮影装置(Time lapse system)によって撮影したところ、心筋細胞は始め格子壁を沿って移動するものの、そのうち4隅を支えにしてその場にとどまり一部分裂し、隣り合う細胞同士で結びつき、次第に太い紡錘状の細胞からなる網を形成した。完成したネットワークでは、心筋細胞同士が規則正しく配列し、全体が同期して収縮をすることが確認された。Rhodamine phalloidin 染色を施したところ、心筋のアクチン繊維が規則正しい構造をとることが確認された。通常ディッシュ上で培養した細胞は規則正しい配列を示さなかった。【結語】マイクロパターン付き細胞培養ディッシュを使用し、心筋細胞を規則正しい配列を持つ網状に培養することに成功した。

Y-10. 流動食を高粘張にすると胃排出は促進される

群馬大学医学部附属病院光学医療診療部¹, 群馬大学²

下山 康之¹, 草野 元康¹, 河村 修², 財 裕明², 名越 淳人², 栗林 志行²,
樋口 達也², 杉本 さやか², 前田 正毅², 保坂 浩子², 森 昌朋²

【目的】近年経管栄養法の適応患者が増加し、高粘張度の流動食の方が誤嚥などの呼吸器合併症が少ないとの報告もあるが、この詳細な機序は不明である。我々は経口流動食の粘張度の変化が胃排出へ及ぼす影響を検討した。【方法】H. pylori 陰性の健常人男女 11 例(平均年齢 27.0 歳)に 6 時間以上の絶食後、流動食 K-3S (キューピー), 400 kcal/400 ml (N 群, 粘張度 8cp) を投与し、血糖値 (mg/dl), 血中インスリン (μ U/ml), ガストリン (pg/ml) の測定を摂取 1 時間後までは 15 分ごと, 1 時間後以降 3.5 時間までは 30 分ごとに行った。胃排出は連続的 ¹³C 呼吸測定装置 (Breath ID, イスラエル), 胃内圧測定は 3-channel microtransducer を使用した。胃食道逆流の観察のため LES 圧を Dent sleeve 付きの infused catheter 法, LES 上 5 cm の食道内 pH を microglass 電極で記録した。同様の検討を 1 週間以上の間隔をあけて同一被験者において粘度調整剤(ペクチン 90 ml, キューピー)を加え粘張度を増加させたとき(P 群, 900 cp), また水道水 400 ml のみ, の合計 3 回同様の検討を行った。【成績】胃排出 (GEC/4h) および摂取後 45-60 分, 60-75 分の胃前庭部の motility index (mmHgsec) は N, P 群でそれぞれ (2.78 ± 0.1 (SE), 3.01 ± 0.1), (6.6 ± 4.6 , 526 ± 237), (2.3 ± 2.3 , 448 ± 173) であり, いずれも P 群で有意に ($p < 0.05$) 高値であった。血糖値は摂取後 60 分で N, P 群でそれぞれ (126 ± 4.7 , 142 ± 6.0), であり, P 群で有意に高値であり, インスリンは P 群で高値の傾向 ($p = 0.08$) を認めた。ガストリン, 一過性 LES 弛緩や胃食道逆流の回数に有意な差は認めなかった。【結論】流動食を高粘張度にすると健常人において胃排出は促進した。低粘張度の流動食は摂取直後の十二指腸内流入により, その後胃運動は抑制され結果として胃排出は遅延した。高粘張度の流動食が呼吸器合併症を抑制する機序は胃排出促進効果が関与していると推測された。

Y-11. マイクロパターン付き細胞培養ディッシュを用いた新規マイグレーションアッセイ法の開発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科循環器内科¹, 株式会社クラレくらしき研究所²,
株式会社クラレつくば研究所³

三浦 大志¹, 中村 一文¹, 西 泰治², 浦川 茂美¹, 鶴田 仁志³, 田崎 剛³,
福田 始弘³, 赤木 達¹, 三浦 綾¹, 草野 研吾¹, 大江 透¹

【背景】近年, 培養細胞の特性, 薬剤感受性, 毒性反応を評価する方法として細胞の遊走(マイグレーション)能が測定されている。これまで細胞の遊走能を評価するために用いられてきた方法がポイデンチャンパー法である。しかしながら, ポイデンチャンパー法では実験効率が悪く, さらに個々の細胞の遊走能を評価することはできない。今回我々は, マイクロパターンを持つ樹脂の上で細胞を培養し, 個々の細胞の遊走能を定量化出来るか検討をおこなった。【方法】ヒト肺動脈平滑筋細胞を, 100 μm 四方の区画に囲まれたマイクロパターン付きディッシュ上に培養した。低血清 (0.1%FBS), 低血清 (0.1%FBS)+血小板由来増殖因子(PDGF) (10 ng/mL) および高血清 (10%FBS) を含む培養液 (DMEM/F12) 下において, コマ撮り顕微鏡撮影装置 (Time lapse system) によって 24 時間撮影し, 個々の細胞が何区画移動したか計測した。【結果】ヒト肺動脈平滑筋細胞は, 低血清, 低血清+PDGF, 高血清の培養液において, 移動度はそれぞれ, 1.0 ± 0.4 , 2.9 ± 0.3 , 4.8 ± 0.5 (区画/24 hours) ($n = 10$ cells) であり, 低血清にくらべ PDGF ($P < 0.01$) 高血清 ($P < 0.0001$) においてその遊走能は有意に増加した。【結語】マイクロパターン付き細胞培養ディッシュを使用することにより, 個々の細胞の遊走能を定量化することに成功した。本システムにより個々の細胞の僅差の遊走能の検討が可能であると考えられる。

Y-12. $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮における NCX1 膜輸送分子複合体の役割

福岡大学医学部薬理学¹, 福岡大学医学部生理学²

喜多 紗斗美¹, 井上 隆司², 岩本 隆宏¹

$\alpha 1$ 受容体は, さまざまな臓器血管の神経性調節に重要な役割を果たしている。 $\alpha 1$ 受容体を介する血管収縮機序には, TRP チャンネルなどの受容体活性化カチオンチャンネルの関与が考えられているが, 未だその全容の解明には至っていない。最近, 我々は $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮 (Ca^{2+} 動員) に, 1 型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX1) が関与することを示す実験的証拠を得た。実験には, 血管平滑筋特異的 NCX1 過剰発現マウス (TG) および野生型マウス (WT) の摘出灌流腸間膜動脈 (内径約 100 μm) を用いた。この血管に Fluo4-AM を負荷した後, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度と血管径を同時測定したところ, WT に比べて TG の血管ではフェニレフリン刺激時の細胞内 Ca^{2+} 濃度増加および血管収縮が有意に増大していることを見いだした。これらの反応は特異的 NCX1 阻害薬 SEA0400 により抑制された。興味深いことに, TG にノルエピネフリンの高用量を静脈内投与すると, 冠動脈スパズムに起因する房室ブロックが誘導され短時間で死に至った。この心臓死は SEA0400 の前処置により防御可能であった。これらの結果は, $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮に NCX1 を介する Ca^{2+} 流入が関与することを示唆している。さらに, この分子機序を解析する目的で, NCX1 と各種 TRP チャンネルとの相互作用を解析したところ, NCX1 は TRPC3 チャンネルと分子複合体を形成することが判明した。そこで, 血管平滑筋特異的 TRPC3 過剰発現マウスを作成したところ, このマウスでは $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮反応が著明に亢進していること, またその反応は SEA0400 で抑制可能であることを確認した。以上の結果から, NCX1 は TRPC3 と膜輸送分子複合体を形成することにより, $\alpha 1$ 受容体刺激による血管収縮に関与するものと考えられた。

一般演題

P-1. カハール介在細胞は一酸化窒素を受容する

福井大学医学部形態機能医科学講座人体解剖学神経科学領域

飯野 哲, 堀口 和秀, 野条 良彰

一酸化窒素 NO は、消化管において運動や分泌吸収活動を制御する重要な因子である。NO は標的細胞の細胞質中に存在する soluble guanylate cyclase (sGC) を活性化し GTP を cGMP に変換し、cGMP が 2 次メッセンジャーとして多数の分子 (cGMP-dependent kinase, cGMP-dependent phosphodiesterase, cyclic nucleotide-gated channel) に作用する。私たちは消化管筋層における NO 情報の伝達経路を探り、NO の標的細胞を解析する目的で、モルモット盲腸筋層を免疫組織化学的に検索した。sGC は筋層内のカハール介在細胞 (interstitial cells of Cajal ; ICC), 線維芽細胞, 神経細胞に発現した。特に双極性細胞に強い発現が見られ 99% が c-Kit を発現する ICC-IM であった。ICC-IM は sGC の $\alpha 1$ 及び $\beta 1$ サブユニットを共に発現し、NO により cGMP を産生すると考えられた。ICC-IM は NOS 含有神経終末に近接して分布していた。摘出筋層標本に sodium nitroprusside (SNP) による NO 刺激を phosphodiesterase 阻害剤 IBMX と zaprinast 存在下で行うと、ICC と神経線維に cGMP 産生が観察された。SNP 刺激を行わない標本、sGC 阻害剤 ODCQ を加えた標本、phosphodiesterase 阻害剤を用いない標本では cGMP 産生が非常に少なかった。筋層平滑筋細胞においても cGMP 産生が少量ながら観察された。cGMP により活性化される cGMP-dependent protein kinase I (cGKI) の分布を観察すると、ICC と平滑筋細胞、神経細胞に観察された。モルモット盲腸筋層において、NO 情報伝達に関与する分子群 sGC, cGMP, cGKI が ICC に発現することが明らかとなった。ICC は NO の機能的受容体 sGC を発現し cGMP を産生、cGMP は少なくとも cGKI を介して作用すると考えられる。

P-2. モルモット近位結腸におけるカハール介在細胞

福井大学医学部形態機能医科学講座人体解剖学神経科学領域

堀口 和秀, 飯野 哲, 野条 良彰

カハール介在細胞 (interstitial cells of Cajal ; ICC) は消化管筋層に分布し、腸蠕動運動のペースメーカー、ないしは神経伝達の仲介の機能を担う細胞である。我々は今回、モルモット近位結腸のカハール介在細胞について組織学的、微細形態学的検討を行った。カハール介在細胞の組織学的描出には、同細胞の特異マーカーである抗 c-KIT 抗体による免疫組織化学法を用いた。凍結切片による c-KIT 免疫染色の結果、従来報告されている縦走輪走各筋層内、両筋層間および輪走筋最内層-粘膜下層境界部 (筋層下領域) に加え、粘膜下結合組織内と漿膜下層においてもカハール介在細胞が認められた。筋層全載伸展標本による c-KIT 免疫染色では、筋層内のカハール介在細胞は神経線維に付随する双極性の細胞として観察された。一方、筋層間および筋層下領域におけるカハール介在細胞は多極性の形態を示し、それぞれの部位でほぼ二次元的なネットワークを形成していた。粘膜下層のカハール介在細胞は紡錘形の、漿膜下層のものは細胞体から多方向に突起を伸ばす星状の形態を示し、それぞれネットワークを形成していることが明らかとなった。電子顕微鏡による解析から、粘膜下結合組織中のカハール介在細胞は豊富なミトコンドリアやカベオラ、基底膜を有するなど、従来報告されてきたカハール介在細胞と同様の微細形態学的特徴を示し、線維芽細胞や平滑筋、マクロファージなどとは明瞭に識別された。また同細胞はギャップ結合により同種細胞間で連結しており、粘膜下結合組織中における特殊な細胞性ネットワークの存在が微細形態レベルでも確認された。以上の結果より、モルモット近位結腸におけるカハール介在細胞の分布は従来知られている以上に複雑であることが明らかとなった。

P-3. セロトニンによる消化管運動ペースメーカー細胞の調節機構

名古屋大学大学院医学研究科細胞生理学¹, 名古屋大学大学院医学研究科機能形態学²,
名古屋市立大学大学院薬学研究科³

劉 紅年¹, 西沢 祐治², 大矢 進³, 中山 晋介¹

【目的】セロトニンは、脳内には全体の2%しかなく、その95%以上が胃腸管に存在する、現代人はストレスを感じた時に胃腸の具合が乱れている。従って、胃腸管自発性運動のリズムの根源はペースメーカー細胞内のCa oscillationであることがわかってきました。本研究では、セロトニンによる腸管運動ペースメーカー機構調節の実験を主体に行いました。【方法】1. マウス小腸由来培養細胞小塊 Cell cluster の作成 BALB/C マウス生後20日の腸筋層を摘出した後に、酵素処理することにより作成した細胞小塊 (Cell cluster) を培養し、この標本に fluo-3AM を室温下でロードし、Fluo-3 蛍光強度の変化を細胞内 Ca 濃度変動の指標として記録した。2. 細胞外電位測定マウスの腸管から、平滑筋層を得る。これに薬剤を投与し、ICC の電気活動を64チャンネル細胞外電位記録システムで記録する。【結果】Nifedipine, TTX の存在下で5-HT を投与後に ICC の Ca oscillation の駆動、維持することを観察された。同時に細胞外からの Ca 流入阻害剤である, SK&F96365 は Caoscillation を抑制した。これらの結果は、5-HT 受容体のシグナルは細胞外からの Ca 流入を引き起こすことによって ICC のペースメーカー活動を促進することを示唆している。【考察】セロトニンは、腸管の運動に影響を与えて広く知られている。また、うつ治療薬として SSRI が使われていることより、うつ病の症状にセロトニンが深く関わっていることは明らかである。本研究では、セロトニンが ICC に作用し、そのペースメーカー機能を賦活していることを示した。今後この研究を発展させることにより、うつ病における消化器症状発生のメカニズムを明らかにすることが期待できる。

P-4. 胃切除術後の胆道運動障害

町田市民病院外科¹, 東京慈恵会医科大学外科²

羽生 信義^{1,2}, 西川 勝則^{1,2}, 川野 勸^{1,2}, 田中 雄二郎^{1,2}, 岩渕 秀一^{1,2}, 大平 洋一²,
梶本 徹也², 古川 良幸², 中田 浩二², 鈴木 裕², 川崎 成郎², 仲吉 朋子²,
松本 晶², 谷島 雄一郎², 矢永 勝彦²

胃切除術後胆石症は神経温存や幽門輪温存によってその発生を抑えることができるという報告があるが、明らかなエビデンスはない。そこで実験的、臨床的に胃切除術後の胆道機能を検討した。「方法および結果」1. 犬 ($n=5$) を用い、胃全摘術を施行し、Roux-Y で再建した。食物が十二指腸を通過しなくても食後 CCK が上昇し、これに一致して胆嚢も収縮した。しかし早期に CCK が低下し、胆嚢が拡張した。2. 幽門側胃切除術既往のある症例 ($n=3$) のオッジ括約筋運動を測定した。ヒトのオッジ括約筋は約5回/分の収縮を示し、胃切除術の既往のない症例 ($n=11$) ではセルレイン投与によりその収縮は抑制された。胃切除術既往のある症例ではセルレインによる抑制効果が消失した。「考察」1. 食後早期の胆嚢の拡張は消化管内容の排出促進による CCK 分泌の変化によるものと考えられる。2. 幽門上部での切離ではオッジ括約筋のセルレインに対する paradoxical response はおこらないという報告があり、幽門下部での十二指腸離断が paradoxical response を引き起こすと考えられる。「結論」理論的には内容の排出促進の防止と幽門上部の切離、すなわち幽門温存によって胃切除術後胆道運動障害を軽減しようと考えられる。実際に胆石症の発生が防止できるかは前向き臨床試験が必要である。

P-5. 胃・空腸および味蕾における GABA 合成酵素, グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) の発現とその意義

奈良女子大学生活環境学部食物栄養学科¹, 京都府立大学解剖学教室²,
群馬大学大学院医学研究科³, 理化学研究所脳科学総合研究センター⁴, 大阪医科大学解剖学教室⁵

植野 洋志¹, 赤松 香奈子^{1,5}, 中村 友美^{1,5}, 河田 光博², 柳川 右千夫³, 小幡 邦彦⁴,
渡辺 正仁⁵

【目的】グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) はグルタミン酸を基質とし, 脱炭酸反応を触媒することで, 生体内で γ -アミノ酪酸 (GABA) を合成する酵素である. GAD にはアイソフォーム (GAD67 と GAD65) が存在し, 組織によっては同時に発現したり, どちらかのアイソフォームのみの発現が観察されている. ノックアウトマウスの研究より, アイソフォームの役割分担が示唆されている. GAD は, 高等生物の中枢や膵臓では多く発現することが報告されているが, 消化器系組織での発現様式については, 未だ不明な点が多い. 本研究では, 組織免疫化学染色法, RT-PCR 法, そして, 遺伝子改変マウスを用いて胃・空腸・味蕾における GAD の発現を検討したので報告する. 【方法】ICR マウス, GAD67-GFP ノックインマウスを用いた. 組織免疫化学染色は, パラフィンもしくは凍結による切片を作成し, 定法の処理を施したのち, 抗 GAD 抗体と反応させ, 蛍光ラベルした二次抗体により可視化した. また, GAD67-GFP ノックインマウスの切片は, そのまま蛍光顕微鏡下で観察した. RT-PCR は, GAD65 もしくは GAD67 の配列に特異的な DNA プライマーを設計し, BioRad 社の iCycler を用いて行った. 【結果と考察】胃と空腸では, 胎児期から 11 週齢までのマウスにて GAD67 および GAD65 の発現を確認できた. 胃・空腸ともに, 局所的に発現する細胞が存在することが判明した. 胃では, 胃酸分泌を担う細胞に, 空腸では, ホルモン分泌などに関与する細胞に発現しているのではないかと想像される. 味蕾では, GAD67 は III 型の味蕾細胞に発現することが判明した. GAD65 の発現も認めている. また, 発現している GAD67 は GABA を合成していることより, 酵素としての機能をもつものと考えられる. 今後, 消化器系組織での GABA の役割を探究したい.

P-6. 摘出ラット小腸のニコチンによる反応性の加齢に伴う変化

武蔵野大学薬学部安全性学

入江 かをる, 氷見 敏行

【目的】摘出ラット十二指腸のニコチンによる反応性は授乳期のコリン作動性神経を介する収縮反応から, 成熟期の NO 神経を介する弛緩反応に変化する (Irie et al, 1991 & 1994). 高齢者では, 消化管の機能低下がみられるが, 本研究では, 老齢ラット小腸のニコチンによる反応性について, 幼若および成熟動物と比較した. 【方法】2, 3, 8 週齢, 12 および 24 ヶ月齢の Wistar 系雄性ラットの摘出回腸および 12 指腸標本の運動性を, マグヌス法により研究した. 【結果および考察】12 指腸のニコチンによる反応性は既に報告した通り, 2 週齢では収縮反応, 8 週齢では弛緩反応であった. 12 ヶ月齢ではニコチン 0.01-1 mM による弛緩反応は小さくなり, 24 ヶ月齢では更に小さくなった. 2 週齢の回腸は 12 指腸と比べると筋層も薄く, 標本の 50 mM KCl による反応性も小さかった. ニコチン 0.01-1 mM により回腸は収縮したが, アトロピン 1 μ M による抑制は不完全でコリン作動性神経以外の関与が示唆された. 3 週齢から 24 ヶ月齢までの回腸の反応性はいずれも一過性の短い弛緩反応に続いて収縮反応を示した. いずれの Age でもこのニコチンによる回腸の反応性はテトロドトキシン 1 μ M で抑制された. 一過性の弛緩反応は L-ニトロアルギニンメチルエステル 100 μ M で抑制されたので NO 神経を介すると思われるが, 収縮反応はアトロピンで抑制されず, NANC 神経を介する反応と考えられた. 【結語】摘出ラット 12 指腸のニコチンによる反応性は, 幼若期の収縮反応から成熟期の弛緩反応, 老齢期の反応性低下と Age によって大きな変動を示し, 副交感神経節後線維の分布様式が成長に伴って変わると考えられた. 一方, 回腸のニコチンによる反応性は授乳期で弛緩反応が見られなかった他は, Age による変化は認められなかった.

P-7. 胃電図による胃術後運動機能評価

川崎医科大学消化器外科

村上 陽昭, 松本 英男, 長塚 良介, 窪田 寿子, 東田 正陽, 河邊 由貴子,
平林 葉子, 岡 保夫, 奥村 英雄, 伊木 勝道, 浦上 淳, 山下 和城, 平井 敏弘,
角田 司

消化管機能のひとつの検査法として、胃電図があるが、単極誘導であったため、臨床応用には導入が難しかった。4チャンネルが同時に解析できる胃電図システムが新たに開発された。健康人、胃切除患者の胃電図を測定し、比較検討した。対象は40歳以上の健康人14人、胃部分切除7人、迷走神経温存腹腔鏡補助下幽門側胃切除術6人、幽門側胃切除7人に4チャンネル胃電図を施行した。安静、仰臥位で空腹時に胃電図を測定した。空腹時は20分間、測定した。胃電図はMedtronic社製のPolyGraf EGG Extension Cable 4channels, EGG表面電極を用いて測定した。POLYGRAM NETで分析、記録した。空腹時測定が終了すると、市販のおにぎりを2個、お茶を摂取させ、同様の肢位で、直後に胃電図を20分間測定した。食事負荷前後の正常優位周波数の時間的割合、各チャンネルの伝播率を比較した。食事負荷により各術式とも、正常優位周波数の増加を認めた。伝播率は幽門側胃切除が他の術式に比して劣っていた。4チャンネルで同時に測定解析できるシステムであり、胃術後機能評価に有用である可能性が示唆された。

P-8. 局所神経反射によるラット食道運動の調節機構

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学教室

嶋 剛士, 増田 和明, 椎名 貴彦, 志水 泰武, 武脇 義

【背景と目的】消化管平滑筋の運動は、中枢由来の外來神経に加えて、壁内の内在神経によっても制御されていることが知られている。しかし、食道横紋筋では、内在神経の存在が形態学的には明らかになっているものの、その機能はあまり分かっていない。そこで、本研究では、筋層が横紋筋のみからなるラットの食道を用いて、食道横紋筋運動に対する内在神経の役割を解析した。【材料と方法】ラットから食道を分離し、オルガンバス中にて、フォーストランスデューサーを用いて食道運動を記録した。また、³H-cholineを用いて、食道標本からのアセチルコリン(ACh)放出量を測定した。【結果と考察】食道を支配する迷走運動神経を電気刺激したところ、食道標本は単収縮した。その収縮反応はd-ツボクラリンによって完全に消失したことから、横紋筋の反応であると考えられる。この単収縮はカプサイシン投与によって抑制された。さらに、迷走運動神経を電気刺激した食道標本からのACh放出量を測定したところ、カプサイシンはACh放出を減少させた。カプサイシンには知覚神経を刺激する効果がある。そのため、この結果は、ラット食道には横紋筋運動を抑制する内在性の制御機構が存在し、カプサイシンはその経路を興奮させることを示唆している。このカプサイシンによる食道運動抑制効果は、タキキニン受容体拮抗薬や一酸化窒素(NO)合成酵素阻害薬の投与によって阻害された。これらの結果は、食道横紋筋にはタキキニンおよびNO作動性神経から構成される局所神経反射経路が存在しており、その反射経路は、ACh放出を介して、食道横紋筋運動を抑制していることを示唆している。

P-9. Soilingの有無からみた各種肛門括約筋温存術後症例の新直腸肛門機能について

日本歯科大学生命歯学部外科学

富田 涼一

【目的】Soilingの有無からみた直腸癌低位前方切除術(LAR)、潰瘍性大腸炎J型回腸囊肛門吻合術(IPAA)、Hirschsprung病Duhammel法(DP)などの術後症例における、直腸肛門生理学機能について比較検討した。【対象と方法】LAR 36例(側方郭清20例; A群, 無し16例; B群), IPAA 18例(C群), DP 6例(D群)で男46例, 女14例, 16歳-71歳, 平均56.9歳。直腸肛門内圧(AM), 陰部神経(PT), 脊髄神経刺激伝導時間(SMT), 肛門管粘膜電流感覚閾値(AS)などの生理学的検査を行った。【成績】soilingはA群60.0%, B群12.5%であり, C, D群には認めず。AM: 静止圧, 最大随意収縮圧, 直腸感覚でA群がB群より, A, B, C群がD群より有意に不良であった($p < 0.01$)。PT: A群がB群より, A, B, C群がD群より有意に不良であった($p < 0.01$)。SMT: A群がB群より, A, B, C群がD群より有意に不良であった($p < 0.01$)。AS: A群がB群より($p < 0.05$), A, B群がC, D群より有意に不良であった($p < 0.01$)。ARD: A群がB群より($p < 0.05$), A, B群がC, D群より有意に開大を示した($p < 0.01$)。【結論】soilingは, LAR側方郭清群とIPAA群に多く認められ, 内・外肛門括約筋機能, 新直腸および肛門感覚閾値低下, 陰部・脊髄神経伝導時間遅延を明らかに認めた。すなわち, 骨盤神経叢温存, 内・外括約筋および恥骨直腸筋の愛護的手術操作が, soilingの防止に繋がると思われた。

P-10. 結腸内カプサイシン投与の結腸運動亢進・排便誘発効果とその作用機序

東北大学生体調節外科

林 啓一, 柴田 近, 舟山 裕士, 上野 達也, 長尾 宗紀, 工藤 克昌, 佐藤 学, 佐々木 巖

「背景」排便時, 大腸には波高が高く伝播速度の速い巨大伝播波収縮(giant migrating contractions, GMCs)が出現し, 下痢時にはこのGMCsが頻発することが報告されている。GMCsを制御することは下剤や排便誘発剤の開発へとつながる可能性がある。「目的」capsaicin結腸内投与の回・結腸運動, 排便に及ぼす効果とそのメカニズムを検討する事「方法」ビーグル犬を用い strain gauge force transducerを回腸末端, 結腸に縫着・固定し, 消化管の輪状筋収縮を測定した。生理食塩水, Capsaicin 1, 2.5, 10 mgを結腸内投与し, 消化管運動と排便に対する効果を検討した。さらに拮抗薬として atropine, hexamethonium, ondansetron, FK224, propranololの存在下での capsaicin結腸内投与の消化管運動と排便に対する効果も検討した。「結果」capsaicin 5 mg, 10 mgの投与直後から結腸にGMCsを高頻度に誘発し, 排便を誘発した。生理食塩水, capsaicin 1 mg, 2 mgの投与ではGMCs・排便の誘発はなくCMCsと呼ばれるGMCsより波高が低く伝播速度の遅い収縮波の亢進も認めなかった。Atropineと hexamethonium 存在下では capsaicin結腸内投与のGMCs・排便誘発効果は抑制されたが, その他の拮抗薬はこの排便誘発効果を抑制しなかった。「結語」capsaicin結腸内投与は結腸運動を亢進させ排便を誘発し, その作用はコリン作動性神経を介すると考えられた。

P-11. 排便時の結腸巨大収縮運動 GMC に対する研究：エリスロマイシン誘導体：GM-611 の結腸運動への影響

独立行政法人国立病院機構栃木病院小児外科¹, 慶應義塾大学小児外科²,
聖路加国際病院小児外科³, 中外製薬株式会社⁴

平林 健^{1,2}, 森川 康英², 松藤 凡³, 星野 健², 羽金 和彦¹, 尾崎 賢一⁴

排便時は、あるときは、完全に排泄されたと感じ、またあるときは、残便感を感じることがあるが、消化管運動(特に結腸巨大収縮運動：GMC)と排便との関係は、不明な部分が多い。今回、我々は、ビーグル犬を用いて、消化管運動(特に GMC)と排便時のイヌの行動の比較解析をおこなった。さらに、併せて、上部消化管運動改善作用のあるモチリンアゴニスト (GM-611：中外製薬)の下部消化管運動改善作用の有無に対しても検討を加えた。方法) フォースストレーンゲージ法(胃体部・回腸末端より 20 cm 口側・回腸末端より 10 cm 口側・上行結腸・横行結腸・下行結腸・S 状結腸・直腸)を用いて消化管運動を計測・記録し、同時に暗視カメラを用いてイヌの行動を記録し、自然排便時と GM-611 投与後 12 時間の消化管運動とイヌの行動を比較解析した。各部位の消化管運動は、収縮を 10 分間毎に時間で積分したものを Motor-index として定量化し評価した。排便時の GMC は、発生部位と、GMC-index (収縮と持続時間の積分值)で評価した。結果) 自然排便時の GMC は、発生部位は上行結腸 (9.2%) 横行結腸 (38.3%) 下行結腸 (42.6%) S 状結腸 (9.9%) と分かれ、同一個体内でも差が認められた。GMC motility index は、日中に観察されたものが夜間帯よりも大きかった。投与後の消化管運動は、約 1 時間後をピークに胃から S 状結腸まで亢進されていた。投与後 12 時間の排便時に観察された GMC は、発生部位の口側偏移と GMC-index の増加が認められた。結語) 排便時の GMC の発生部位は広範囲にわたっているが、発生部位と排便量・排便後の残便感の有無との関係は不明であり、今後の研究が必要と考えられた。また、今回用いられたモチリンアゴニスト (GM-611) は、結腸運動を亢進し、消化管内容に対して Wash-out 効果を持つと考えられた。

P-12. マウス ES 細胞由来消化管様構造形成過程の平滑筋細胞分化に対するエタノールの影響

北九州市立大学大学院国際環境工学研究科¹, 産業医科大学医学部第 1 解剖学²,
産業医科大学医学部第 2 解剖学³, 奈良県立医科大学医学部第 2 生理学⁴

平野 雄¹, 中島 民治², 土肥 良秋³, 高木 都⁴

妊娠時に継続してアルコールを摂取すると胎児性アルコール症候群と呼ばれる胎児の発育障害、中枢神経系の異常、および器官形成不全等が発症する危険性が知られている。そこで、我々は消化管形成過程におけるエタノール曝露の影響を検討するために平滑筋細胞分化に着目した。実験にはマウス ES 細胞 (EB3 細胞) から hanging drop 法により構築した腸管様細胞塊 (ES gut) を用いた。まず、エタノール (0, 1, 3, 5%) 含有培地中で ES gut を形成させ、平滑筋細胞特異的に発現する遺伝子 α -SMA および ICC 細胞と平滑筋細胞の gap junction 関連遺伝子である Cx43 の発現変化を RT-PCR 法により検討した。また、その他の消化管構造に関係する遺伝子 c-kit (ICC 細胞に発現)、GATA4 (消化管上皮細胞に発現)、および分化マーカー遺伝子 oct3/4 の発現変化についても同様に検討した。その結果、3% と 5% エタノール処理群において c-kit および GATA4 発現が有意に低下していたが、 α -SMA および Cx43 発現の変化は認められなかった。また、ES gut 数 20 個あたりの自発運動を示す個数を調べたところ、エタノール処理群で減少していた。以上の結果より、ICC 細胞および消化管上皮細胞分化はエタノール曝露により抑制されるものの、平滑筋細胞分化は正常に進行する可能性、および平滑筋細胞分化は自発運動制御とは直接関連しない可能性が考えられた。さらに、EB3 細胞のエタノール曝露時の生存率を 3 種類のマウス株化細胞 (NCTC 細胞, Neuro2a 細胞, Swiss 3T3 細胞) と比較した。その結果、EB3 細胞は、Neuro2a 細胞, NCTC 細胞, Swiss 3T3 細胞よりも生存率が低く、エタノール感受性がより高いことが明らかとなった。現在、免疫組織染色法を用いて平滑筋細胞の分化を形態学的に検討している。

P-13. 原始的多細胞動物における消化管の機能的領域化メカニズムの遺伝的解析

国立遺伝学研究所発生遺伝

清水 裕, 高久 康晴, 野呂 行彦

多細胞動物で最も原始的なものの一つとされる腔腸動物の消化管は2層の上皮筋細胞とその間にある散在神経という非常に単純な構造からなる。長さが5-10ミリくらいの単純な壺で複数の器官への分化は認められない。このような単純な構造のため、腔腸動物の消化管は器官分化、機能分化などが起こる以前の原始的な消化管の姿を今に残すものと考えられてきた。我々は、ヒドラ消化管で多様な消化運動を観察し、その運動機能がほ乳類に近いことを以前報告した。本研究の概要は以下の通りである。1) 腔腸動物ヒドラで消化管の同一部域から切り出した組織の数珠つなぎを行い、均一な組成の消化管を形成した。そのような移植体の消化運動を観察した結果、組織の部域由来に依存した運動機能の違いを見出した。この結果は、消化運動機能に部域依存的な違いが認められること、つまり、消化管の機能的領域化が多細胞体制が形成された初期段階ですでに起こっていた可能性を示唆すると考えられる。ヒドラの体軸上の位置依存的に発現する遺伝子 *wnt*, *brachyury* が、上記領域化に及ぼす影響を調べた。2) 腔腸動物だがヒドラよりもより原始的なネマトステラは、ぜん動のような協調的運動にとって不可欠であるとされているギャップ結合が上皮組織間に認められないという希少な多細胞動物である。この動物の体幹がぜん動を行うがその機構はよくわかっていない。我々は、ヒドラとの比較実験や、コンピューターシミュレーションを用いた解析によって、ギャップ結合がない状態でもぜん動が起こりうることを示し、その機構について解析を行った。

P-14. ラット回腸輪走筋の収縮運動に対する短鎖脂肪酸の影響

静岡県立大学生活健康科学研究科環境物質科学専攻環境生理学研究室¹, 花王²

田副 秀章¹, 小野 茂之^{1,2}, 唐木 晋一郎¹, 桑原 厚和¹

我々は腸内細菌によって生成される短鎖脂肪酸の受容体として GPR43 の局在について報告し【Cell Tissue Res 324: 353-360】、さらに短鎖脂肪酸の腸管平滑筋活動に及ぼす影響についても報告している【Neurogastroenterol Motil 17: 585-594】。短鎖脂肪酸は遠位結腸では神経性、非神経性の収縮を誘導する。また GPR43 タンパクが回腸終末部の粘膜上皮にも強く発現していることを観察している。回腸終末部はその解剖学的位置から短鎖脂肪酸の生成部位である盲腸に近い。内容物の逆流により短鎖脂肪酸にさらされることが考えられる。これらの結果は回腸終末部においても短鎖脂肪酸により平滑筋活動が影響を受ける可能性を示唆している。そこで本実験ではラット回腸終末部から短冊状の輪走筋-粘膜標本を作製し、輪走筋活動に対する短鎖脂肪酸(プロピオン酸)の影響について検討した。なお平滑筋の収縮活動は等尺性に記録した。輪走筋の自発性収縮は標本を装置に装着後120分ほどで安定し、その頻度は 3.7 ± 0.8 回/分 ($n=18$) であった。このような標本にプロピオン酸 5mM を作用させると、自発性収縮の頻度は 7.5 ± 1.3 回/分 ($n=6$) に増加し、その5分後には自発運動は消失した。またプロピオン酸投与直後に観察された自発性収縮頻度の増加はアトロピンの前投与により 3.2 ± 1.5 回/分 ($n=5$) に抑制された。さらにプロピオン酸はトーンスにも影響を与え、プロピオン酸投与後はトーンスの上昇が観察された。このトーンスの上昇はピロキシカムの前投与により抑制された。これらの結果から自発性収縮頻度の増大にはアセチルコリンの関与が、またトーンスの上昇にはプロスタグランジン類の関与が示唆された。以上のことから回腸終末部においても短鎖脂肪酸に対する化学受容機構が存在する可能性が示唆された。

P-15. 下大静脈再生過程における結合組織、平滑筋再生の組織学的検討

埼玉医科大学消化器一般外科¹, 奈良県立医科大学²

合川 公康¹, 宮澤 光男¹, 鳥井 孝宏¹, 大谷 吉秀¹, 小山 勇¹, 筏 義人²

【目的】虚血部に細胞を注入し、血管を新生させる、あるいは再生させる治療法が開発されているが、実際にどのような血管がどのように新生、再生してきているのか全く不明であり、血管新生、再生に対し評価する経時的、組織学的指標がない。そこで、今回我々は、現在、下大静脈(IVC)再建用のパッチとして開発している生体吸収性ポリマーを用い、IVCの構築成分の内、結合組織、平滑筋がどのように再生するかを検討した。(方法)雑種ブタの肝下部下大静脈を3×2 cm大に切除し、その部分に同じ大きさの生体吸収性ポリマーで作製したパッチを移植した。細胞は播種しなかった。パッチは約8週で生体内で吸収されるように設計した。パッチ移植後2週, 3, 6ヶ月, 1年でパッチ部の組織を採取し、結合組織の主構成要素である膠原線維と弾性線維の量(弾性線維/弾性線維+膠原線維)を測定し、下大静脈再生過程における結合組織再生を組織学的に評価した。(結果)IVC再生過程における結合組織再生は、その厚さとしては、パッチ移植後徐々に増加し、パッチ移植後1年でnative IVCの約90%となった。結合組織中の膠原線維に対する弾性線維の割合は、IVC再生過程において徐々に増加し、パッチ移植後1年においては、native IVCの弾性線維の割合を100とすると、native IVCの約90%であった。IVCの平滑筋再生は再生1年でnative IVCの約50%であった。(結論)IVCが全層性に欠損した場合のIVC再生過程において、結合組織は徐々に増加し、その結合組織の内でもIVCが弾力性を保持し、強固となるように弾性線維が増加してくる。このような結合組織再生がnative IVCと同様に再生するためには約1年以上を要することが示された。これらの結果を考慮し、これを一つの静脈再生の基準として大静脈再生を評価可能と考えられた。

P-16. オカダ酸の脳血管弛緩作用におけるプロテインキナーゼCを介するミオシン軽鎖3リン酸化の関与について

静岡県立大学大学院薬学研究所薬理学教室

小原 一男, 中山 貢一

【目的】血管平滑筋の収縮は、20 kDaのミオシン軽鎖(MLC)のリン酸化に依存し、そのリン酸化はミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)とミオシンホスファターゼ(MLCP)のバランスによることが知られている。一方、我々はイヌ脳底動脈において伸展刺激によるプロテインキナーゼC(PKC)を介するMLCの3リン酸化が収縮に対し抑制的に作用する可能性を報告した。また、ホスファターゼ阻害薬オカダ酸(OA)は、血管平滑筋において高濃度では収縮作用を、低濃度では弛緩作用を持つことが知られている。しかし、OAの血管平滑筋弛緩作用機序については未だ不明な点が多い。本研究ではイヌ脳底動脈におけるOAの弛緩作用とMLCの3リン酸化の関係について検討した。【方法】イヌ脳底動脈リング標本の等尺性収縮を測定した。MLCのリン酸化は等電点電気泳動法/イムノブロット法により、また、PKCのリン酸化はSDS-PAGE/イムノブロット法により測定された。【成績】低濃度(1 μM)OAは、イヌ脳底動脈の80 mM KCl収縮を細胞内Ca²⁺濃度を変化させずに弛緩させた。この弛緩作用は、クラシカルPKC阻害薬Go6976(1 μM)存在化で抑制されたが、PKCδ阻害薬ロトレリン(5 μM)では抑制されなかった。一方、OAによりMLCリン酸化の亢進が認められた。このとき、MLCのリン酸化部位はSer-19, Thr-18およびThr-9に相当する3ヶ所であった。OAによるMLCのリン酸化はGo6976により抑制されたが、ロトレリンでは影響されなかった。さらに、OAによりPKCαのリン酸化が増加した。【結論】イヌ脳底動脈において、OAの脳血管弛緩作用にPKCαを介するMLCの3リン酸化が関与する可能性が示唆された。

P-17. ニワトリ前腸間膜動脈縦走平滑筋細胞における興奮性神経筋接合部電位の特徴

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学教室

平山 晴子, 志水 泰武, 椎名 貴彦, 武脇 義

【背景と目的】哺乳動物の腸間膜動脈は輪走筋のみで構成されているが、鳥類ではその外側に縦走筋が存在することが知られている。しかし、この鳥類に特有の縦走筋に関する知見は乏しい。そこで本研究では、微小ガラス電極法を用いて、ニワトリ前腸間膜動脈縦走平滑筋細胞から興奮性神経筋接合部電位 (EJP) を導出し、その特徴を明らかにすることを目的とした。【材料と方法】実験には白色レグホン雄を用い、摘出した前腸間膜動脈の縦走平滑筋細胞にガラス電極を挿入し、膜電位を導出した。EJP の誘発には、経壁電気刺激 (EFS) を用い、神経伝達物質阻害剤の影響を調べた。また、各種神経伝達物質を作用させ、EFS による EJP との類似性を検討し、神経支配様式を解析した。【結果と考察】縦走平滑筋細胞の静止膜電位は輪走平滑筋細胞よりも浅く、 -35 mV 付近であった。EFS を標本に加えたところ、非常に持続時間の長い (約 25 sec) EJP が記録された。アトロピンの適用により振幅がやや減弱し、プラゾシンで持続時間がわずかに短縮した。この非アドレナリン非コリン性の EJP は、ATP 受容体阻害剤であるスラミンで完全に消失した。血管平滑筋に対する ATP 作用は、P2X 受容体を介するとされているが、縦走平滑筋の EJP は P2Y 受容体阻害剤で抑制された。また、P2Y 受容体アゴニストを作用させると、顕著な脱分極が生じた。これらの結果から、ニワトリ前腸間膜動脈縦走筋の EJP は、ATP の P2Y 受容体を介する作用で発現し、非常に長い持続時間を持つことが明らかとなった。

P-18. ニワトリ後腸間膜動脈縦走平滑筋の成長に伴う発達とその神経支配様式

岐阜大学大学院連合獣医学研究科獣医生理学教室

宮澤 誠司, 志水 泰武, 椎名 貴彦, 武脇 義

【背景と目的】ニワトリ前腸間膜動脈 (AMA) の外膜には縦走平滑筋が存在し、興奮性のコリン作動性神経と抑制性のアドレナリン作動性神経の支配を受けていることが知られている。一方、後腸間膜動脈 (PMA) についての報告はほとんどない。そこで本研究では PMA の筋構造と神経支配様式について AMA と比較検討した。【材料と方法】実験には白色レグホンを用い、摘出した AMA および PMA に HE 染色を施し形態学的観察を行った。また AMA および PMA をマグヌス装置に設置し、縦走筋の収縮反応を記録した。収縮反応の誘発には、経壁電気刺激 (EFS) を用い、神経伝達物質の阻害剤の影響を調べた。さらに各種神経伝達物質を作用させ、EFS による収縮が再現されるか否か検討し、神経支配様式を解析した。【結果と考察】AMA 外膜には雌雄問わず縦走筋が存在していたが、PMA 外膜においては雌では発達した縦走筋が存在するものの、雄では観察されなかった。また未産卵の幼弱な雌においても縦走筋層は顕著ではなく、産卵の開始に伴い筋層が発達することがわかった。AMA および PMA の縦走筋はともに、EFS に対して収縮と弛緩の二相性応答を示した。弛緩反応は、いずれにおいてもプロプラノロールで抑制され、ノルエピネフリンにより再現された。アトロピンの処置は、AMA の収縮反応を抑制したが、PMA では無効であった。これとよく一致し、PMA 縦走筋ではアセチルコリンによる収縮が認められなかった。一方、セロトニンを作用させた場合には、PMA 縦走筋において、顕著な収縮が惹起された。これらの結果から、PMA 縦走筋に分布する抑制性神経は、AMA と同様にアドレナリン作動性であるが、興奮性神経はコリン作動性ではなくセロトニン作動性であることが示唆される。

P-19. 発達期において血管ネットワークの選択的消退誘導を司る平滑筋：虹彩の新しい機能

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム循環生理学

毛利 聡, 森実 祐基, 成瀬 恵治

【背景】発達段階における水晶体の表面は瞳孔膜と呼ばれる血管網で覆われている。瞳孔膜は水晶体上皮細胞を栄養した後、光路の透明性を保つためアポトーシスにより消退する。しかし、瞳孔膜のアポトーシスを誘導する因子については十分解明されていない。我々はラット眼において、瞳孔膜の消退時期に一致して自律神経にて制御される虹彩の運動能（縮瞳能・散瞳能）が成熟することに着目し、“虹彩の動き”が瞳孔膜のアポトーシスを誘導しているのではないかと考えた。（方法）瞳孔膜の消退メカニズム検討のため、瞳孔膜消退の時間経過を検討し、点眼薬を用いた虹彩の自律神経反応抑制による血流の変化を生体ビデオ顕微鏡にて観察した。瞳孔膜消退の起こる生後7日から14日の間4時間毎に散瞳、縮瞳薬および生理食塩水を点眼し、3群間の血管消退時間経過（血管分岐点数にて定量）とアポトーシス惹起細胞（TUNEL）、遊走マクロファージ（ED-1）について検討した。（結果）生後12日目に生体顕微鏡を用いて瞳孔膜の血管分岐数を定量したところ、散瞳群では有意に血管消退が抑制されており、アポトーシス惹起血管内皮細胞の割合も対照群に比べて有意に低かった（ $0.6 \pm 0.2\%$ vs $4.4 \pm 0.6\%$, $p < 0.01$ ）。また、マクロファージの遊走も抑制されていた（ $9.0 \pm 1.0\%$ vs $14.6 \pm 0.9\%$, $p < 0.05$ ）。縮瞳薬により強い縮瞳を繰り返した群は対照群と差を認めなかった。（まとめ）虹彩はカメラにおける絞りの役割を果たしており、自律神経による制御（縮瞳・散瞳）によって眼球に入る光量の調節、光学収差の減少、焦点深度の調節を行っている。我々はこれらの虹彩機能に加えて発達期の全く新しい機能：水晶体を栄養し光路上に存在する血管ネットワーク（瞳孔膜）の短期間且つ選択的な消退への関与、があることを明らかにした。

P-20. ウシ毛様体筋のカルバコール誘発収縮における Gq/11 共役経路の関与

旭川医科大学生理学講座自律機能分野

安井 文智, 宮津 基, 高井 章

【背景】毛様体平滑筋の収縮は、その初期相、持続相とも筋細胞膜表面に存在する M_3 サブタイプのムスカリン受容体の刺激により調節される。一般にこのタイプの受容体の関与する反応は、 $G_{q/11}$ 蛋白 (G_q) に共役した信号伝達経路を介して発現するとされるが、毛様体筋の収縮調節系にも該当するという実験的な確証は得られていない。最近、depsipeptide の一種 YM-254890 (YM) が G_q の働きを特異的に抑制することが報告された。今回、ウシ毛様体筋においてカルバコール (CCh) で誘発される収縮、細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇および受容体作動性非選択性陽イオンチャネル (NSCC) 電流に対する YM の効果を検討した。【方法】等尺性張力記録にはウシ毛様体から摘出した平滑筋束を用いた。酵素処理で単離した毛様体筋細胞を用い、Fluo-4 蛍光法により細胞内 Ca^{2+} の変動を、膜電位固定法により全細胞膜電流を記録した。膜の固定電位は $-100 \sim +100$ mV (通常 -50 mV) とした。【結果と考察】 $2 \mu M$ の CCh 投与により発生した収縮の持続相に YM ($0.05-10 \mu M$) を投与すると、収縮は濃度依存性に抑制された。収縮が完全に抑制されたあとに YM を数時間にわたり洗い流すと CCh への反応性は時定数 140 min の指数関数的な時間経過で緩徐に回復した。単離細胞において、CCh ($2 \mu M$) は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と、二種類の NSCC 電流の活性化を起したが、YM ($3-10 \mu M$) の細胞外投与は、それらの初期相、持続相とも完全に抑制した。これらの YM の抑制作用発現はいずれも時間依存性で、特に $30^\circ C$ 以下の温度では著しく遅延した。毛様体筋のムスカリン受容体刺激による収縮には、初期相、持続相とも G_q に共役した信号伝達経路が関与していることが強く示唆された。

P-21. 毛様体筋収縮調節に関与する信号伝達分子の細胞膜局在

旭川医科大学生理学講座自律機能分野

宮津 基, 高井 章

【背景】毛様体筋のムスカリン受容体を介する収縮調節においては、細胞膜レベルにおける信号伝達に M₃ 型ムスカリン受容体 (M₃R), G_{q/11}, TRPC イオンチャネルの各種サブタイプなどが連携して関与することが示唆されている。今回の実験では、これらの信号伝達分子の細胞膜内またはその周辺における局在の検討を行った。

【方法】酵素処理によりウシ毛様体から単離した平滑筋細胞を、fibronectin 処理したガラス小円盤表面で短期間 (1-5 日) 培養したのち、低浸透圧下で超音波パルスを加えて細胞体を除去し、ガラス表面に細胞内側を露出して残った細胞膜を用いた。それらをまず各種の特異的二次抗体で処理したのち、数種の AlexaFluor 色素を結合させた二次抗体を用いて可視化し顕微鏡観察を行った。各一次抗体とも抗 α アクチン抗体と併用して二重に染色した。断らない限り、一次抗体を作用させる直前に 4% paraformaldehyde (PFA) による固定処理を施した。

【結果】細胞膜標本の、 α アクチン陽性領域に集中して、M₃R, G_{q/11}, TRPC1, TRPC3, TRP4 および TRP6 に特異的な抗体の結合を示す蛍光スポットが、いずれも 1 μm^2 以上という高密度で検出された。PFA による固定処理を省略すると G_{q/11} 抗体による染色に基づく蛍光スポットは著しく減少したが、M₃R と各種 TRPC 抗体による染色はほとんど影響されなかった。

【結論】ウシ毛様体筋の細胞膜における、M₃R, G_{q/11} と TRPC1, TRPC3, TRP4 および TRP6 の局在が確認された。受容体やイオンチャネルと異なり膜貫通ドメインを持たない G_{q/11} は、膜内面に比較的弱く結合して存在していることが伺われる。

P-22. クエン酸アルペリンのモルモット膀胱平滑筋への作用

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞生理学分野,

名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野²

早瀬 麻沙^{1,2}, 橋谷 光¹, 矢内 良昌², 窪田 泰江², 小島 祥敬², 佐々木 昌一², 郡 健二郎², 鈴木 光¹

【目的】クエン酸アルペリンは、平滑筋弛緩作用があると報告されており、海外では過敏性大腸症候群や月経困難症に対し臨床応用されているが、平滑筋組織への作用機序は明らかでない。今回我々は、モルモットの膀胱平滑筋に対するクエン酸アルペリンの作用および作用機序について検討した。【方法】モルモットをセボフルレン麻酔下に断頭し、膀胱を採取して粘膜を剝離した。最外側の筋層から単一筋線維標本を作製した。実験は、等尺性張力測定法、細胞内カルシウム濃度測定法 (Fura-PE3) および細胞内微小電極法を用いた。【結果】クエン酸アルペリンは膀胱平滑筋の自発収縮と一過性カルシウム濃度上昇の振幅と頻度を増大させた。また、活動電位の振幅を増大させ、再分極相を遅延させた。クエン酸アルペリンの自発収縮に対する作用はカリブドトキシンで抑制されたが、CPA, BayK4688 では抑制されなかった。クエン酸アルペリンにて増加した収縮および活動電位は、ニフェジピン投与により消失した。アセチルコリンまたは高カリウム溶液 (40 mM K⁺) によって誘発された収縮は、クエン酸アルペリンによって主に持続相が抑制された。またクエン酸アルペリンは高カリウム溶液およびアセチルコリンによるカルシウム濃度上昇をあまり抑制しなかった。【考察】クエン酸アルペリンが消化管平滑筋を弛緩させるという報告があるが、今回我々はモルモットの膀胱平滑筋においてクエン酸アルペリンの単独投与では自発収縮張力および頻度を増加させるという結果を得た。この作用は主に活動電位の再分極の抑制によると考えられた。一方、アセチルコリンまたは高カリウム溶液によって誘発された収縮は、クエン酸アルペリンによって抑制された。この作用は細胞内カルシウム濃度や電位発生頻度の変化を伴わずに生じた。今後 *in vivo* での効果およびヒト膀胱平滑筋への作用等のさらなる検討により、臨床的な応用への展望が期待されると思われる。

P-23. フェノキサジン化合物 2-Amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one によるモルモット盲腸収縮抑制のメカニズム

東京医科大学細胞生理学講座¹, 東京医科大学生化学講座²

ムサ サイピディン¹, 渡辺 賢¹, 友田 あき夫², 小西 真人¹

【背景と目的】フェノキサジン化合物 2-Amino-4,4 α -dihydro-4 α -7-dimethyl-3H-phenoxazine-3-one (Phx-1) の急性作用として, 平滑筋を弛緩させる (Musha et al., 2005). そこで Phx-1 の平滑筋弛緩効果の作用点を解明を目的として, モルモット腸管平滑筋収縮に対する Phx-1 の効果を様々な条件で検討した. 【方法】オス, ハートレー系モルモットから盲腸紐を摘出した後に筋肉条片を作成し, 張力測定装置に固定して, 等尺性張力応答を測定した. 一部の標本では, 細胞膜を界面活性物質 β -escin によって化学的に破壊したスキンド処理を行い, Phx-1 の収縮タンパク質系への影響を検討した. 【結果】55 mM K による脱分極, 又, 自律神経・筋接合部作動薬アセチルコリン (ACh) 刺激は, 細胞膜を破壊していない盲腸紐生筋標本の収縮反応を惹起した. Phx-1 は 55 mM K 刺激, ACh 刺激による収縮反応をいずれも可逆的に抑制し, その IC₅₀ はおおよそ 100 μ M であった. Phx-1 の平滑筋生筋収縮抑制効果は, 細胞内 Ca ストアを Ca イオンフォア A23187 で破壊した標本においても同様に観察された. 一方, 細胞外からの Ca イオン流入を抑えた条件で, ACh やカフェイン刺激を行い, 細胞内 Ca ストアからの Ca イオン放出によって惹起される収縮は Phx-1 によってほとんど抑制されなかった. 又, 細胞膜を破壊した標本の Ca イオン活性化収縮反応は, 高濃度の Phx-1 によって僅かに抑制された. 【結論】以上の結果から, Phx-1 が主に細胞膜を介する Ca イオン流入機構を阻害することで, 盲腸紐平滑筋収縮を抑制することが示唆された.

P-24. Imidazole 緩衝液におけるモルモット盲腸紐の高エネルギーリン酸化合物含量

文京学院大保健医療理学療法学科

石田 行知, 坂井 泰

アミン緩衝液は Na⁺ などの影響を調べたいときに重炭酸緩衝液の代わりにしばしば用いられる. 我々は imidazole 緩衝液を用いたときに盲腸紐の高エネルギーリン酸化合物含量を調べたところ, phosphocreatine (PCr) 含量が選択的に低下することを観察したので, この低下の性質を検討した. 【方法】雄モルモットから盲腸紐を摘出し, 長さ約 1 cm の平滑筋標本を作製した. この標本を imidazole または重炭酸を緩衝剤とする生理溶液中に懸垂した. imidazole 溶液は 100% O₂ として重炭酸溶液には 95% O₂: 5% CO₂ を通気した (pH 7.4, 37°C). 高エネルギーリン酸化合物 (ATP および PCr) は熱湯抽出法により抽出し, luciferase 発光法を用いて定量した (Ishida et al., 1986). 【結果】盲腸紐を重炭酸溶液から imidazole 溶液に移すと, 漸次 PCr 含量が低下し, 30 分を超えるとほぼ枯渇したが, ATP 含量には変化が観察されなかった. Imidazole 溶液から重炭酸溶液に戻すと, PCr 含量は徐々に回復した. このような選択的な PCr 含量の低下は, imidazole 溶液だけでなく, Tris 緩衝液でも観察された. 高濃度 K⁺ による収縮反応は重炭酸溶液と imidazole 溶液では大きな変化はなかった. 【考察】Imidazole 緩衝液中での選択的な PCr 低下は, creatine kinase が抑制されたときの高エネルギーリン酸化合物の変化と相似している. Triton-X100 で作成した盲腸紐スキンド標本では, creatine kinase 阻害は ATP 存在下での Ca²⁺ 張力発生に大きな影響をおよぼさない (Ishida and Paul, 未発表). よって, imidazole 緩衝液中では盲腸紐の creatine kinase が抑制されていると考えられるが, 真の原因は未知である.

P-25. II型ミオシン ATPase 阻害薬 blebbistatin による相性平滑筋収縮抑制のメカニズム

独立行政法人科学技術振興機構, CREST¹, 東京医科大学・細胞生理学講座²,
群馬大学大学院・医学系研究科・臓器病態薬理学³

小比類巻 生¹, 渡辺 賢^{1,2}, 小濱 一弘³, 片山 豪³, 田中 秀幸³

ミオシン II 阻害剤 blebbistatin の相性平滑筋収縮に対する影響を明らかにする目的で, 細胞膜破壊 (スキンド) 標本の力学応答に対する blebbistatin の影響を検討した。モルモット盲腸紐, 門脈及びラット肛門尾骨筋を β エスシン処理及び Ca²⁺ ionophore A23187 によって作成したスキンド標本において, 3 μ M 以上の blebbistatin は Ca²⁺ 活性化張力を非可逆的に抑制したが, 収縮の Ca²⁺ 感受性には全く影響しなかった。その IC₅₀ はおよそ 3-4 μ M であった。Blebbistatin による収縮抑制時には, 細胞のミオシン頭部の配列とアクチン線維配列の乱れが観察された。更に, ミオシン頭部の形状変化がおり, ミオシンフィラメントの一部が解離している可能性が示唆される。以上の結果は, blebbistatin は myosin ATPase 活性抑制によるクロスブリッジ形成阻害のみならず, 収縮タンパク質フィラメントの形態やその配列を攪乱することによって平滑筋収縮を抑制することを示唆する。

P-26. 気管平滑筋の高濃度 K⁺ 誘発性収縮におけるモネンシンの影響

日本獣医生命科学大学獣医薬理学教室

金田 剛治, 斎藤 瑞穂, 荒井 優, 小武 俊行, 浦川 紀元, 中條 眞二郎,
清水 一政

第 47 回日本平滑筋学会総会において, 我々は低濃度のモネンシン (0.1 μ M) がモルモット膀胱においてミトコンドリアの好氣的代謝を抑制することにより高濃度 K⁺ 誘発性収縮を弛緩することを報告した。今回, 我々は ウシ気管平滑筋の高濃度 K⁺ 誘発性収縮における高濃度のモネンシンの抑制機序について検討した。1) モネンシンは高濃度 K⁺ 誘発性収縮を濃度依存性に抑制し, 10 μ M で最大抑制効果を示し, その IC₅₀ 値は 4 μ M であった。2) 栄養液中の細胞外 Na⁺ 濃度の減少はモネンシン (10 μ M) による高濃度 K⁺ 誘発性収縮の抑制を減弱した。3) モネンシンは fura2 法による高濃度 K⁺ 誘発性収縮張力と細胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) レベルの同時測定において収縮張力を抑制したが, [Ca²⁺]_i レベルには有意な変化を示さなかった。4) ウシ気管平滑筋においてモネンシンは収縮に変化を示さない 0.1 μ M および最大抑制を示す 10 μ M の濃度において高濃度 K⁺ 誘発性の酸素消費量とともに抑制したが, ホスホクレアチンおよび ATP 含量には影響しなかった。また, NaCN (1 mM) は高濃度 K⁺ 誘発性の酸素消費量の増加を顕著に抑制したが, 収縮張力, ホスホクレアチンおよび ATP 含量にはわずかな変化しか示さず, モルモット膀胱とは異なり, 収縮に必要なエネルギーが解糖系に依存する可能性を示した。5) β エスシン (80 μ M) 処置 30 分間で脱膜化した標本において, モネンシン (1 および 10 μ M) は濃度に依存して Ca²⁺ 誘発性収縮を有意に抑制したが, Na⁺ (30 mM) は Ca²⁺ 誘発性収縮に影響しなかった。これらの結果はモネンシンによるウシ気管の高濃度 K⁺ 誘発性収縮の抑制機序が主に収縮蛋白の Ca²⁺ 感受性低下によることを示唆する。

P-27. 気道平滑筋細胞における内因性 MMP-1 による細胞周囲コラーゲン線維の分解とそれによる調節作用

九州大学大学院医学研究院生体情報薬理

大池 正宏, 太田 良紀, 木村 千稚

【背景と目的】IL-4 や IL-13 などの Th2 サイトカインは気管支喘息の原因となる。我々は第 48 回日本平滑筋学会総会において、培養気道平滑筋細胞を包埋したコラーゲンゲルのアゴニストによる収縮が、IL-4 によって抑制され、IL-13 によって増強されること、さらにマトリックスメタプロテアーゼ 1 (MMP-1, 間質コラーゲナーゼ) の産生がこれらのサイトカインによって増加することを報告した。本研究はこれらの背景に基づき、MMP-1 による気道収縮調整機序を検討することを目的とした。【方法】本研究では培養ウシ気道平滑筋細胞を使用し、これをコラーゲンゲルに包埋した *in vitro* 再構築系を作成した。細胞包埋コラーゲンゲルの微細構造観察には走査型電子顕微鏡 (SEM) を、さらにその収縮能はゲル表面積を計測することで評価した。【結果】対照ウシ気道平滑筋細胞包埋ゲルを SEM で観察すると、平滑筋細胞に微細なコラーゲン線維が密に絡まる様子が観察された。一方、IL-13 で 6 時間処理したゲルでは、平滑筋細胞周囲のコラーゲン線維は太く変化して細胞を取り巻くバスケット様に再分布していた。これに対し、IL-4 で 6 時間処理したゲルではコラーゲン線維が細胞周囲のみ溶解しており、平滑筋細胞がコラーゲン線維に囲まれずに露出していた。また、外因性に MMP-1 をコラーゲンゲルに投与したところ、低濃度 (10 ng/ml) の投与時には IL-13 処理と同様にコラーゲンが太く再分布しており、高濃度 (100 ng/ml) の投与時にはコラーゲン線維は溶解傾向を示した。この結果はサイトカインによって平滑筋細胞培養上清中に放出される MMP-1 の量が IL-4 で IL-13 より多量であったこととよく一致していた。【考察】以上の結果は、気道組織の収縮が平滑筋細胞周囲のコラーゲンの再分布や溶解によって内因性 MMP-1 で調節されるという、全く新しい平滑筋収縮制御機構を示唆しており、この機序がサイトカインによる気道過敏性発生病因の一部である可能性が考えられた。

P-28. 虹彩括約筋における各種ホスホジエステラーゼ阻害剤による弛緩と環状ヌクレオチドの関連

日本獣医生命科学大学獣医外科学教室¹, 日本獣医生命科学大学獣医薬理学教室²

余戸 拓也¹, 金田 剛治², 根津 欣典¹, 原田 恭治¹, 原 康¹, 多川 政弘¹,
浦川 紀元², 清水 一政²

ホスホジエステラーゼ (PDE) には多くのアイソザイムがあり、PDE1 から 5 型にはそれぞれ選択的な阻害剤が存在し、これらの阻害剤による平滑筋弛緩の効力には臓器差がある。血管平滑筋では PDE3 型阻害剤が最も強い効力を、気管平滑筋では PDE3 および 4 型が、膀胱平滑筋では PDE1 および 5 型が強い効力を示すことが報告されてきた。我々も、消化管平滑筋である回腸および盲腸紐では PDE5 型阻害剤の効力が強く、胆嚢では PDE4 型が強いことを示してきた。今回我々はブタ虹彩括約筋のカルバコール収縮に対する PDE1-5 型の阻害剤の抑制効果と環状ヌクレオチドの関連について検討した。1) アデニル酸サイクラーゼ活性化薬であるフォルスコリンおよびグアニル酸サイクラーゼ活性化薬であるニトロプルシドは虹彩括約筋のカルバコール誘発性収縮をいずれも濃度依存性に抑制した。2) PDE1-5 型の阻害剤はいずれも濃度に依存してカルバコール収縮を抑制したが、IC₅₀ 値から比較した効力はザプリナスト (5 型, 4.5 μM) > Ro20-1724 (4 型, 58.3 μM) > EHNA (2 型, 92.4 μM) > ミルリノン (3 型, 99.4 μM) > ビンボセチン (1 型, >30 μM) の順に強かった。3) ビンボセチン、ミルリノンおよび Ro20-1724 は組織内 cAMP 含量を有意に増加したが、EHNA およびザプリナストでは変化はみられなかった。4) EHNA およびザプリナストは濃度に依存して組織内 cGMP 含量を有意に増加したが、ビンボセチン、ミルリノンおよび Ro20-1724 では変化はみられなかった。以上の結果から、ブタ虹彩括約筋のカルバコール誘発性収縮において PDE5 型阻害剤であるザプリナストが最も抑制効果が大きいこと、またその抑制には cGMP 含量の増加が関連することが示唆された。

P-29. モルモット回腸縦走筋および気管平滑筋における carbachol (CCh) 収縮に対する mitogen-activated protein kinase (MAPK) 阻害薬の効果

日本大学薬学部機能形態学¹, 東邦大学薬学部薬理学²

木澤 靖夫¹, 池野 徹¹, 齋藤 清茂¹, 小池 勝夫², 草間 貞¹

【目的】Gタンパク質共役受容体を介した平滑筋収縮にミオシンリン酸化説だけでは説明できない機構が関与しているとの報告が相次いでいる。その一つとして、MAPKによる収縮促進系の存在が挙げられる。本研究では、モルモット回腸縦走筋および気管平滑筋におけるCCh収縮に対するMAPKの関与を明らかとするために、MAPK阻害薬の効果と比較検討した。【方法】雄性Hartley系モルモットより回腸および気管を摘出し、常法に従い回腸縦走筋および気管平滑筋標本をオルガンバス内に懸垂し、張力を等尺性に記録した。リン酸化MAPKは、平滑筋lysateのWestern blottingにより検出した。【結果および考察】p38阻害薬SB203580は早い時間経過で収縮を生じる回腸縦走筋のCCh収縮には影響を与えなかったが、比較的遅い時間経過で収縮を生じる気管平滑筋における低濃度域のCCh収縮を有意に抑制した。MEK阻害薬PD98059は回腸縦走筋における高濃度域のCCh収縮を有意に抑制したが、気管平滑筋においては低濃度域のCCh収縮を抑制した。一方、JNK阻害薬SP600125は、回腸縦走筋および気管平滑筋両者においてCCh収縮を有意に抑制した。さらに、リン酸化MAPK量は、CCh適用により増加し、対応する阻害薬処理によって減少することが観察された。気管平滑筋において、p38およびMEK阻害薬は低濃度域のCCh収縮を抑制し、最大収縮にはほとんど影響を与えなかった。このことは、MAPK阻害薬が気管平滑筋の収縮閾値を低下させること等によると考えられる。以上の結果は、所属臓器の相違により平滑筋のCCh収縮に対するMAPKの関与が異なることを示している。MAPK阻害薬は、喘息やCOPD等の病態に関与する炎症性サイトカイン産生抑制作用を有するが、本研究で得られた知見は、p38阻害薬が気道平滑筋の異常収縮を選択的に抑制する可能性を示唆している。

P-30. ラット顎筋の収縮特性

鶴見大学歯学部生理学

大貫 芳樹, 三枝木 泰丈

【目的】下顎位の維持や複雑な顎運動を司る各種顎筋の生理機能を明らかにするため、ラットの閉口筋(咬筋, 側頭筋)および開口筋(顎二腹筋)の収縮特性とエネルギー代謝特性をスキンド標本レベルで解析すると共に、スキンド標本のミオシン重鎖アイソフォームの構成を調べた。【方法】ウイスター系雄性ラットの咬筋, 側頭筋, 顎二腹筋からトリトン処理スキンド標本(長さ1.5~2 mm, 直径150~200 μm)を作製した。発生張力-ATPase活性同時測定装置を用いて、スキンド標本の等尺性収縮張力-ATPase活性-Ca²⁺濃度関係を解析した。その後、標本のミオシン重鎖アイソフォームの構成をSDS-PAGE法にて定量的に解析した。【結果と考察】スキンド標本の等尺性収縮張力およびATPase活性は、Ca²⁺濃度の上昇(pCa=8.0~4.5)と共にS字状に増大し、それらのCa²⁺濃度感受性は、咬筋, 側頭筋に比べて顎二腹筋で有意に(P<0.001)高いことが観察された。また、ATPase活性は発生張力の増大と共に直線的に増大し、張力コスト(直線の勾配, ATPase活性/発生張力)は、咬筋, 側頭筋に比べて顎二腹筋で有意に(P<0.0001)低いことが観察された。スキンド標本のミオシン重鎖アイソフォームの構成を解析した結果、咬筋, 側頭筋はほぼ速筋線維で構成されているのに対し、顎二腹筋は遅筋線維と速筋線維で構成されていることが観察された。以上の結果から、エネルギー消費の高い速筋線維で構成される閉口筋(咬筋, 側頭筋)は咀嚼運動などのphasicな機能に関与するのに対し、エネルギー消費の低い遅筋線維を含む開口筋(顎二腹筋)は下顎位の維持などのtonicな機能を演じていることが示唆される。

P-31. Myosin VI の血液細胞における発現と局在の検討

北里大学医学部医療系大学院¹, 北里大学医学部血液内科学², 杏林大学医学部解剖学³

白田 茂樹¹, 宮崎 浩二², 川上 速人³, 東原 正明²

【目的】Myosin VI は非古典的ミオシンの一つであり, 真核細胞では vesicular membrane trafficking や endocytosis に重要な働きをしている. Myosin VI は唯一アクチンフィラメントの plus end 方向に動くが, 血液細胞における機能や局在については不明である. 今回, 我々は, ヒト白血病細胞株における myosin VI の発現および局在を調べた. 【方法】細胞内局在は, 免疫蛍光顕微鏡および免疫電子顕微鏡で調べた. 12 種のヒト白血病細胞株は 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 100 units/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin を含む RPMI 1640 で培養した. 一部の細胞は TPA (20 nM) 存在下でも培養した. Western Blotting および RT-PCR は既報に従った. 【成績】RT-PCR では, myosin VI は, CMK および Meg-01 (血小板・巨核球系), TPA 処理した HL-60 (monocyte/macrophage へ分化), 末梢血単球および血小板で発現をみた. リンパ系細胞株では U266 (形質細胞株) 以外は発現をみなかった. 免疫蛍光顕微鏡での観察では, myosin VI は, Meg-01 および CMK では, Golgi complex に一致して発現していた. 一方, TPA 処理した HL-60 では Golgi complex ではなく, 細胞質内の粗大顆粒に一致して発現をみた. これらは, 免疫電子顕微鏡での観察でも確認された. 【結論】以上より myosin VI は, 血液細胞において, 特に血小板系および単球・マクロファージ系では, 顆粒分泌や endocytosis に重要な働きをしていると考えられた. 現在, 末梢血単球, 血小板における myosin VI の細胞内局在を検討している.

P-32. ヒト子宮平滑筋成体幹細胞の同定とその機能解析

慶應義塾大学医学部産婦人科¹, 慶應義塾大学医学部生理学², 実験動物中央研究所³

小野 政徳¹, 丸山 哲夫¹, 升田 博隆¹, 梶谷 宇¹, 長島 隆¹, 荒瀬 透¹,
太田 邦明¹, 各務 真紀¹, 小田 英之¹, 浅田 弘法¹, 伊藤 守³, 内田 浩¹,
岡野 栄之², 松崎 有未², 吉村 泰典¹

【目的】妊娠時に子宮は劇的な増大を示すことから, その主な構成組織である子宮平滑筋において, 組織幹細胞の存在が示唆される. そこで, 様々な器官・組織に存在し, 組織幹細胞活性を示す side population 細胞 (SP) の分離法を利用して, 子宮平滑筋における幹細胞システムの存在を明らかにすることを目的とした. 【方法】子宮摘出患者の同意を得て正常子宮筋層を採取し, 酵素処理により分散細胞を得て Hoechst 染色した後, 子宮筋 SP (myometrial SP: MSP) を FACS にて分離した. MSP および MSP 以外の子宮筋細胞 (non-MSP) の細胞周期を Pyronin Y + Hoechst 法で, 発現遺伝子・蛋白を RT-PCR および免疫染色法で解析した. MSP の多分化能については, ALP 活性・Oil red O 染色を指標にして, 骨・脂肪細胞への分化誘導を *in vitro* で行うとともに, 重度免疫不全マウスへの移植実験により, MSP が子宮筋様組織を *in vivo* で再構築するかについて調べた. 【成績】MSP は, 幹細胞マーカーである ABCG2 を発現しており, 細胞周期上 G0 期の quiescent な状態を呈していた. MSP は *in vitro* で骨・脂肪細胞へ分化するとともに, *in vivo* では平滑筋マーカーを発現する平滑筋様の組織を構築した. 以上の結果は, non-MSP には認められず MSP に特有であった. 【結論】MSP が, 1) 未分化状態, 2) 多分化能, 3) 自己組織構築能, といった組織幹細胞特性を有することから, 子宮筋において, MSP を中心とする幹細胞システムが存在する可能性が示された. 単離した MSP は, 子宮筋の発生機構, 妊娠・分娩における子宮筋の増殖・退縮・機能発現を解析するうえで有用である.

P-33. 消化管筋層間常在型マクロファージを介した IL-1 β による平滑筋細胞の増殖抑制機構

東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室¹, 動物衛生研究所病理学²,
ネバダ大学医学部リノ校薬理学³

堀 正敏¹, 大浜 剛¹, 百溪 英一², E Margaret³, WT Gerthoffer³, 尾崎 博¹

【背景】消化管の炎症はしばしば平滑筋層の肥厚を伴うが、これには様々な炎症性サイトカインや成長因子が関与する。IL-1 β は消化管炎症に重要な役割を果たすサイトカインであり、単離した平滑筋細胞に対して増殖活性を示すことが知られている。しかし、消化管炎症時に、IL-1 β が平滑筋細胞の増殖活性を増加させ、筋層部の肥厚に関与するかは明らかではない。【目的】IL-1 β が平滑筋細胞の増殖活性にどのように影響するかを、消化管筋層部の組織構造を維持した消化管筋層部器官培養法を用いて解析した。【方法】ラットより回腸を摘出し、無菌的に回腸筋層標本を作製し、これを 199 培地下で器官培養した。細胞増殖活性刺激として 10%FBS で筋を 3 日間器官培養した。【結果】10% FBS 存在下で回腸組織標本を 3 日間器官培養すると、断面積当たりの平滑筋細胞数と PCNA 陽性細胞数が増加し、平滑筋細胞の増殖が認められた。IL-1 β (10 ng/ml) は、この FBS による平滑筋細胞数と PCNA 陽性細胞数の増加を顕著に抑制した。IL-1 β を処置した標本では、COX-2 と iNOS の mRNA ならびにタンパク質の発現増加が認められ、培養液中に PGE₂ と NO の放出が認められた。また、PGE₂ (1 μ M) または NO ドナーである NOC-18 (1 mM) は、IL-1 β 同様 FBS による平滑筋細胞増殖を抑制した。免疫染色により、COX-2 ならびに iNOS のタンパク質を発現する細胞は ED2 陽性の常在型マクロファージであることがわかった。【考察】以上の成績から、消化管組織の形態を維持した状態では、IL-1 β は消化管筋層部マクロファージに作用し COX-2 と iNOS を誘導し、産生される PGE₂ と NO によって、周囲の平滑筋細胞の増殖を抑制する働きをもつことが示唆された。

P-34. アナングミドによって誘発されるラット神経性弛緩反応に対するエタノールの影響

奈良県立医科大学法医学

工藤 利彩, 羽竹 勝彦

【緒言】脳内麻薬として知られるアナングミドは、末梢血管系において強力な弛緩物質として作用し、血管内皮細胞依存性と神経性の 2 つの経路から血管機能を調節することで注目されている。今回我々は、ラット肝動脈におけるアナングミドによる神経性弛緩反応のメカニズムとエタノールの影響について検討した。【材料と方法】Wistar 系雄性ラットの肝動脈の輪状標本を用い、フェニレフリンによる収縮力が最大に達したところで、アナングミドを累積的に添加し、種々の薬物およびエタノール存在下での弛緩率の変化を比較した。また、CGRP (CGRP receptor agonist) による弛緩反応および NS1619 (K⁺ channel agonist) による弛緩反応に対するエタノールの影響も検討した。【結果と考察】アナングミドによる弛緩反応において、NO 合成酵素阻害剤 (L-NNA) および CB1 receptor antagonist (AM251) は抑制しなかったことから、この弛緩反応に対する NO 神経と CB1 receptor の関与は否定された。VR1 antagonist (capsazepine), CGRP receptor antagonist (CGRP [8-37]), K⁺ channel blocker (iberiotoxin) およびエタノールはいずれも弛緩反応を有意に抑制した。CGRP および NS1619 による弛緩反応におけるエタノールの抑制は見られなかった。これらの結果から、アナングミドは、主に、VR1 活性化による CGRP を介した反応とカリウムチャネルを介した反応の 2 つの経路を通じて弛緩反応を引き起こすこと、エタノールはこれらの反応系に神経末端側で抑制的に作用することが明らかになった。エタノールの抑制は、血流変化等をきたし、肝障害などの臓器障害を引き起こす可能性を示唆している。