

第56回日本平滑筋学会総会 抄録

会長講演 (PL)

特別講演 (SL)

漢方セミナー (KS)

栗山賞受賞講演 (KP)

括約筋関連シンポジウム (S1-1～S1-8)

若手の会シンポジウム (YS-1～YS-6)

優秀演題賞候補講演 (YA-1～YA-9)

一般演題 (O1～O10)

ランチョンセミナー (LS1～LS4)

会長講演

PL 消化管運動についての私の関わり

峯 徹哉

東海大学医学部内科学系消化器内科

消化管はさまざまな構造から成り立っている。粘膜、粘膜筋板、粘膜下層、筋層、漿膜(外膜)である。従来から、粘膜の研究、特に癌の研究が消化器病学の中心となってきた。しかし、最近はそれに加え、機能的消化管疾患の臨床研究が盛んに行われるようになった。

消化管の筋層は様々な細胞の集まりからなっている。神経、数種の介在細胞、免疫細胞、筋肉細胞などである。最近、これらの複雑な連携の仕組みが明らかにされている。例えば、カハール介在細胞(ICC)やPDGF受容体 α (PDGFR α)は、ペースメーカー細胞としてギャップジャンクション(GJ)を介して筋肉細胞と連携している。現在、これはSIP syncytiumといわれている。これは特異な受容体やイオンチャンネルや様々な細胞内情報伝達機構から成り立っている。筋電図や圧測定で消化管運動については生理的あるいは臨床的に理解されている部分が多い。しかし、未だに詳細な機構について全て理解されているとは言いがたい。私は長年、基礎研究者あるいは臨床家として細胞間接着装置や消化管運動に携わってきた。特に、ペースメーカー細胞による消化管運動の調節機構に興味を持ち、その役割について研究を行ってきた。これらを私なりに発表してみたい。

特別講演

SL 血管平滑筋細胞と血管石灰化

倉林 正彦

群馬大学大学院医学系研究科臓器病態内科学

冠動脈、頸動脈あるいは大動脈における石灰化は、糖尿病患者や腎透析患者では非常に高率に認められる。長い間、血管石灰化は血管細胞の変性過程におこるカルシウム結晶の受動的な沈着であり、加齢に伴う生理的な現象と考えられていたが、1990年代に入り骨形成に関わるタンパク質の発現が血管石灰化病変に確認されたことを契機に病態生理を解明する基礎研究が進み、現在では、血管石灰化は骨形成に類似した能動的な過程と考えられるようになった。また、血管石灰化は全粥状硬化病変量と直接関係することから、血管石灰化の分子機序の解明は現在の血管生物学の主要課題である。

私たちは、ヒト冠動脈内膜切除標本や頸動脈プラークにはMsx2やRunx2など骨形成に必要な転写制御因子とともにNotchシグナル分子が発現すること、*in vitro*にてヒト大動脈由来血管平滑筋細胞にNotch1を強制的に発現させると、血管平滑筋細胞は骨芽細胞様の細胞に分化し、Msx2をsiRNAによってノックダウンした血管平滑筋細胞ではNotchによる骨芽細胞へ分化はほぼ完全に消失することからNotchはMsx2経路を活性化し、血管石灰化を促進することを報告した。また、最終糖化産物 (AGE) の受容体 (RAGE) の活性化や飽和脂肪酸によって血管平滑筋細胞が骨芽細胞に分化することを報告した。

血管石灰化は骨粗鬆症と合併することが多い。骨粗鬆症では骨吸収が優位になるのに対して、血管石灰化は骨形成が優位になるメカニズムは未だ不明である。私たちは、骨細胞にて産生されるリン利尿因子FGF23がKlotho依存的に平滑筋細胞から骨芽細胞への分化を抑制し、血管石灰化を抑制することを見いだした。FGF23/Klotho経路は、オステオプロテジェリン (OPG) / RANKL/RANK経路とともに骨と血管との臓器連関を担う系である可能性がある。こうした観点から血管石灰化における平滑筋細胞の分化調節機構について発表させていただく。

漢方セミナー

KS グレリンシグナルからみた六君子湯の作用メカニズム

武田 宏司

北海道大学大学院 薬学研究院 臨床病態解析学、北海道大学病院 消化器内科、同 栄養管理部

六君子湯は、消化器内科領域において機能性ディスペプシアに対して比較的良好に使用される方剤である。六君子湯は、ランダム化比較試験においてディスペプシア症状に対する有効性が報告されているが、それとともに食欲不振に対する改善効果も示されている。私たちは消化器癌化学療法にともなう食欲不振の病態を明らかにし、有効な治療法を見いだすことを目的として、小動物を用い、1)シスプラチン投与、2)加齢、3)新奇環境ストレス、による食欲不振モデルを確立し、摂食量低下の機序を検討するとともに六君子湯の有効性を検討した。

シスプラチン投与および新奇環境ストレス下では、セロトニン(5-HT) 2B受容体および5-HT_{2C}受容体が過剰刺激されることにより血中アシルグレリンレベルが低下し、摂食量低下が引き起こされることが明らかとなった。また、六君子湯およびその成分は、5-HT_{2B}および5-HT_{2C}受容体拮抗作用を介して、グレリン低下および摂食量低下を改善することが示された。新奇環境ストレスを加えた高齢マウスでは、視床下部室傍核の5-HT_{2C}受容体の増加と血中アシルグレリンレベル低下を認め、六君子湯が5-HT_{2C}受容体拮抗作用を介して血中アシルグレリンレベルと摂食を回復させることも明らかとなった。さらに、六君子湯およびその成分は、アシルグレリンの代謝酵素を阻害して血中アシルグレリンレベルを上昇させることもわかった。以上より、六君子湯は、グレリンシグナルに対して複数の作用点を有しており、病態に応じて異なる作用機序を発揮すると考えられた。

漢方薬は多成分系薬剤であるため、これまでその作用機構の解明は一般的には困難であると考えられてきた。しかしながら、適切な病態モデルやバイオマーカーを選択することにより、そのユニークな作用機構を明らかにする事は可能であると考えられる。さらに、漢方薬からのアプローチは、食欲不振のように有効な治療手段が確立していない病態の解明や新規治療の開発にも貢献出来るのではないかと期待している。

栗山賞受賞講演

KP1 咽喉頭異常感を伴う胃食道逆流症における食道運動機能異常症の役割—プロトンポンプ阻害薬治療に抵抗する因子の解析

筒井 英明¹、眞部 紀明²、宇野 雅子³、今村 祐志²、鎌田 智有¹、楠 裕明⁴、塩谷 昭子¹、畠 二郎²、原田 保³、春間 賢¹

¹川崎医科大学 消化管内科学、²川崎医科大学 検査診断学(内視鏡・超音波)、

³川崎医科大学 耳鼻咽喉科、⁴川崎医科大学 総合臨床医学

【背景】咽喉頭異常感症の原因の一つとして近年、胃食道逆流症(GERD)が目ざされておられ、特にGERDが原因の場合を咽喉頭酸逆流症(LPRD)と診断している。しかしながら、LPRD患者に対するプロトンポンプ阻害薬(PPI)の奏功率は低く、その病態は不明な点が多い。

【目的】LPRD患者のPPIの奏功率を多数例で検討し、PPIに抵抗を示す患者の食道運動機能の特徴をHigh resolution manometry (HRM)を用いて明らかにする。

【対象および方法】2007年9月から2011年6月の間に、当院消化管内科および耳鼻咽喉科に咽喉頭異常感を主訴に来院した350例(男性165例、平均年齢57.5才)を対象とした。器質的疾患を除外した後、GERDの間診表であるFスケール間診表を実施し8点以上であった患者214例をGERDと診断した。次にこれらの患者に対しPPI倍量(Rabeprazole 20mg/日)を4週間投与し、治療効果を検討した。最後に治療効果が得られなかった患者に対し、治療抵抗群の食道運動機能の特徴を明らかにする目的で、HRMを施行し、性、年齢をマッチさせた健常者と比較検討した。【結果】LPRD患者214例中、55.6%がPPI治療抵抗例であった。治療効果別に患者背景を比較すると、高齢者、男性、Fスケールの合計点の低い症例が治療抵抗例に有意に多かった。更に、PPI治療抵抗例の食道運動機能を検討すると、上部食道括約筋圧、食道体部の蠕動波高、食道体部の正常蠕動波の出現率、complete bolus transitの出現率の各パラメータにおいて健常者との間に有意差が認められた。また、治療抵抗群の47.9%には、何らかの食道運動機能異常が観察され、その内の66.4%にはineffective esophageal motilityであった。

【結論】LPRD症例のPPIの奏功率は44.4%であった。また、食道運動機能異常は、PPI治療に抵抗性を示すLPRD患者の重要な病態の一つと考えられた。

KP2 血管収縮性の内在性概日リズム形成におけるRho-Associated Kinase 2の役割に関する研究

齊藤 寿郎^{1,2,3}

¹九州大学大学院医学研究院分子細胞情報学、²九州大学大学院医学研究院循環器内科、

³Department of Cell Biology and Molecular Medicine, Rutgers New Jersey Medical School

背景

血圧などの心血管系の生理的パラメーターは概日リズムを示し、心血管疾患の発症には日内変動が存在する。血管収縮性の概日リズムはその要因となることが示唆される。中枢と末梢の生物時計が相互作用して血管の収縮性を日内変動させると考えられる。しかし、血管に内在する生物時計と血管の収縮性の関係は、分子レベルで明らかにされていない。

方法・結果

デキサメサゾン処理により培養血管平滑筋細胞の概日リズムを同調させ、その後の時間経過でアゴニスト刺激によるミオシン軽鎖のリン酸化を観察した。周期長25.4時間を持つ明らかな概日リズムが認められ、Rho-associated kinase 2 (ROCK2)の薬理的阻害および発現抑制により、この概日リズムは消去した。ROCK2の発現および活性は、ミオシン軽鎖リン酸化と同位相の概日リズムを示した。時計遺伝子ROR α はROCK2遺伝子のプロモーター活性を上昇させ、一方でROR α の発現抑制によりROCK2の発現リズムは消去した。ROR α タンパクの発現はROCK2mRNAの発現と同位相の概日リズムを示した。野生型マウスの大動脈において、ROCK2の発現は概日リズムを示し、Zeitgeber time (ZT) 0/24で最大値に、ZT 12に最低値に達した。GTP γ S刺激およびトロンボキサンA2類似体U46619刺激が引き起こす筋フィラメントのカルシウム感受性亢進作用およびミオシン軽鎖リン酸化は、ZT 0/24においてZT 12の場合と比べて増大していた。機能的ROR α を欠損するstaggerer変異マウスにおいて、ROCK2の発現および筋フィラメントのカルシウム感受性、ミオシン軽鎖リン酸化の日内変動が消失していた。

結論

ROR α からシグナルを受け、ROCK2は血管収縮性に内在性の概日リズムをもたらす。ROCK2による血管収縮性の概日リズムは、心血管系の生理的パラメーターおよび心血管病発症の日内変動の基盤となる可能性がある。

KP3 GRK2, with β -arrestin2 impairs insulin-induced Akt/eNOS signaling in *ob/ob* mouse aorta

田口 久美子

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学研究室

糖尿病による合併症は、細小血管障害と大血管障害に起因し、いずれの発症進展においても、血糖コントロールのみならず、脂質、血圧、生活習慣などの多くの因子の影響によるさまざまなメカニズムが重複して生じる。これまでに糖尿病性血管合併症の原因の1つとして血管内皮機能の低下、特にNO産生系の障害により生じることが知られているが、多くの因子が複雑に関連しているため、未だに正確な発症進展メカニズムは解明されていない。本研究では、様々な疾患において病態悪化因子として報告されているG-protein coupled receptor kinase 2 (GRK2) に着目し、糖尿病時におけるinsulin誘発NO産生経路の活性減弱とGRK2シグナルの関係について検討した。高インスリン血症を呈する自然発症2型糖尿病モデルマウスである*ob/ob*マウス胸部大動脈(糖尿病群)では、インスリン誘発血管弛緩反応およびNO産生の著名な減少が認められた。これら反応はGRK2阻害薬処置やGRK2 siRNA導入によって増大した。これらの反応はコントロールマウス胸部大動脈(コントロール群)では観察されなかった。一方で、糖尿病群ではGRK2の下流タンパクである β -arrestin2 siRNA導入によってインスリン誘発血管弛緩反応およびNO産生は変化せず、これら反応がコントロール群において抑制された。GRK2のタンパク発現と活性は、糖尿病群で増加していた。さらに、インスリン刺激によって、糖尿病群の細胞膜分画におけるGRK2発現は増加し、 β -arrestin 2やAkt/eNOS経路の活性は減少した。これら反応はGRK2阻害薬処置によって改善した。以上より、細胞膜上へ移行するGRK2と β -arrestin 2は拮抗的に働き、糖尿病病態時胸部大動脈ではGRK2の発現および膜移行の増加が、Akt/eNOS経路のシグナル減少に関与していることが明らかとなった。また、GRK2が糖尿病性血管合併症治療薬の創薬標的になる可能性を提示した。本研究による知見は、糖尿病性血管合併症の発症進展機構の解明や新規治療薬の開発に大きく貢献すると考えられる。

括約筋関連シンポジウム

SI-1 マウス瞳孔括約筋収縮調節にかかわる信号伝達経路の検討

高井 章、宮津 基、赤尾 鉄平

旭川医科大学・生理学講座・自律機能分野

副交感神経支配の平滑筋である毛様体筋と瞳孔括約筋のムスカリン受容体刺激に応じた収縮の持続相においては、他の平滑筋の収縮におけるのと同様、細胞外から流入するCa²⁺が重要な役割を演じている。先にわれわれはウシ毛様体筋を使った電気生理学の実験により、膜電位依存性Ca²⁺チャンネルが発現していないことを特徴とするこの組織において、Ca²⁺流入が2種類の単位コンダクタンスの大きく異なる非選択性陽イオンチャンネル(NSCCLとNSCCS)を介して起ることを示した。一方、RT-PCR法や免疫染色により、M₃アセチルコリン受容体(AchRM3)、G_{q/11}や、NSCCL/Sの分子候補としてのTRPC1、TRPC3、TRPC4、TRPC6およびOrailなどの毛様体平滑筋細胞における発現を確認している。

しかし、眼内平滑筋細胞は、信号伝達系の毛様体筋細胞は伝達物質応答性を保持した状態での培養が困難であり、遺伝子knock-downなどの常套的手段が適用しにくい、電気生理学的に同定されたイオンチャンネルと候補分子との関連を突止めるには至っていない。そこで、正常マウス(129Sv系)、TRPC3/6ノックアウトマウスを用いた実験を開始した。

従来、そのあまりの小ささからこの分野の生理学的研究にほとんど用いられてこなかったマウス眼球の毛様体虹彩領域において、われわれは細胞膜にAchRM3、G_{q/11}、TRPCsやOrailの発現している平滑筋細胞を同定した。一方、微小ながらも輪状に摘出することが可能な瞳孔括約筋を用いてcarbachol刺激による等尺性収縮を安定的に記録する方法を確立した。さらに、単離した瞳孔括約筋細胞における細胞内Ca²⁺測定も安定的に記録が可能になった。これまでの実験から、マウス瞳孔括約筋にもウシ毛様体筋に似たムスカリン受容体作動性のCa²⁺動員機構に加え、膜電位依存性Ca²⁺チャンネルも共存することが明らかになってきた。

SI-2 下部食道括約筋および食道筋運動に対する外来性・内在性神経制御

椎名 貴彦、内藤 清惟、中森 裕之、志水 泰武

岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 獣医生理学研究室

下部食道括約筋(Lower esophageal sphincter: LES)は、食道と胃の境界に存在する平滑筋層から構成されている。食物を摂取していないとき(平常時)、LESは持続的に収縮しており、胃内容物が食道へ逆流することを防いでいる。一方、摂食時には、LESが弛緩することで、摂取した食物が食道から胃へ移動することが可能となる。このように、LESの運動機能は、摂食行動と密接に関連して、調節されている。それゆえ、LESの収縮・弛緩反応が適切に調節されないと、食道アカラシアや巨大食道症、胃食道逆流症(逆流性食道炎)といった食道疾患が引き起こされることがある。例えば、食物を摂取する際にLESが弛緩しなければ、食物が胃に運び込まれずに、食道に停滞してしまい、巨大食道症の発症へとつながっていく。また、LESが日常的に弛緩していると、胃内容物の食道への逆流を招くこととなってしまふ。そのため、LESの運動制御系を正確に理解することは、食道疾患の病態解明および予防・治療にとって極めて重要である。

一方、LESの運動機能は、その上部に位置する食道体部(Esophageal body)とも密接に関連している可能性がある。実際、食道体部の筋間神経叢に由来する神経線維が、LESを構成する平滑筋の一部を支配しているという形態学的知見が報告されている。しかし、LESと食道体部の運動機能調節の関連性については、詳細には検討されていない。

そこで我々は、実験動物(ラット、マウス)から摘出した標本をオルガンバスに設置し、張力トランスデューサーにて機械反応を測定するという実験系を用いて、LESおよび食道体部筋層の運動機能を解析してきた。その結果、それらの筋運動は、脳や脊髄に由来する外来性神経および食道内部の内在性神経によって制御されていることが明らかとなった。本演題では、これまでに解明してきた、LESおよび食道体部筋の運動に対する外来性および内在性神経による調節機構について、報告する。

SI-3 逆流性食道炎発症の原因は下部食道括約筋の機能異常なのか

岩切 勝彦

日本医科大学千葉北総病院 消化器内科

逆流性食道炎発症は食道内の過剰な胃酸曝露により発症し、重症な逆流性食道炎になるに従い食道内の酸曝露時間は有意に増加する。その過剰な酸曝露の重要な原因の一つとして、下部食道括約筋(LES)の機能異常が考えられている。逆流性食道炎発症のためには食道内が過剰な酸に曝露される必要があるが、胃酸逆流のメカニズムには大きくLES圧低値による胃酸逆流と、嚥下とは関係がなくLESが突然弛緩(一過性LES弛緩)した時に見られる胃酸逆流に分類される。健常者、軽症逆流性食道炎患者のほとんどの胃酸逆流は一過性LES弛緩に伴い発生する。重症逆流性食道炎患者では少数回の低LES圧による胃酸逆流はみられるが、多くは一過性LES弛緩時の胃酸逆流である。実際、重症逆流性食道炎のLES圧は健常者、軽症逆流性食道炎に比べ有意な低下がみられる。一過性LES弛緩が主な胃酸逆流のメカニズムであることから、一過性LES弛緩頻度が逆流性食道炎発症に関連している可能性も考えられるが、最も胃酸逆流が発生する食後の座位での一過性LES弛緩頻度をみると健常者、逆流性食道炎患者間に違いはなく、LES圧が低値でない軽症逆流性食道炎においてはLES機能異常を有するとは言えない。それでは逆流性食道炎発症の食道内の過剰な酸曝露はどのように起こるのか。一過性LES弛緩は空気逆流のメカニズムであることから、一過性LES弛緩時には必ずしも胃酸逆流を伴うものではないが、LES口側5cmでの一過性LES弛緩時の胃酸逆流の合併率は健常者に比べ逆流性食道炎患者で有意に高率であり、この合併率の違いが逆流性食道炎発症の大きな要因と考えられている。しかし、われわれの検討ではLES口側2cmの部位では健常者においても一過性LES弛緩時に頻回の胃酸逆流が発生していることが明らかとなり、逆流発生後の胃酸上昇パターンおよび胃酸排出遅延が過剰な胃酸曝露の重要な因子であると考えられ、LES機能異常が主な逆流性食道炎発症の主な原因とは考えにくいと考えられる。

SI-4 Gastroesophageal flap valve(Hill 分類)からみた逆流性食道炎

稲森 正彦¹、井田 智則²

¹横浜市立大学附属病院 消化器内科・臨床研修センター、²大森赤十字病院消化器内科

[背景]逆流性食道炎と食道裂孔ヘルニアの関連は深い。しかし逆流性食道炎の内視鏡分類がほぼ定まっているのに比較して食道裂孔ヘルニアの評価を内視鏡検査で行うことは容易ではない。逆流性食道炎を起こすメカニズムから考えると、下部食道括約筋という観点での評価も重要になると考えられる。この下部食道括約筋の評価も容易ではないが、内視鏡観察下にGastroesophageal flap valve(Hill 分類)を用いて分類する事が試みられている。今回重症の逆流性食道炎に関する因子を検討する際Hill 分類を用いて検討し、その有用性を考察した。[方法]2010年5月から2012年12月までに大森赤十字病院で内視鏡検査を行った症例で、ロサンゼルス分類CまたはDの逆流性食道炎と診断された80名、及び同時期に内視鏡を行った、年齢、性別をマッチさせたロサンゼルス分類でAまたはBの80名を対象とした。内視鏡所見の他、臨床データを収集し解析した。[結果]軽症逆流性食道炎群ではHill-1が2.5%、Hill-2が35%、Hill-3が38.75%、Hill-4が23.75%であった。重症逆流性食道炎群では単変量解析では、Hill-1はなく、Hill-2が11.25%、Hill-3が33.75%、Hill-4が55%であった。重症逆流性食道炎群が明らかにHill分類のグレードが高かった ($p < 0.0001$ by Mann-Whitney U test)。多変量解析では胃粘膜萎縮と逆に正の相関を認めた(odds ratio 2.692, 95%CI 1.700-4.262, $P < 0.0001$)。[孝按]逆流性食道炎の重症化に下部食道括約筋機能が関わっている事を再確認した。文献的考察を加え報告したい。

S1-5 十二指腸乳頭括約筋機能異常におけるダブルマイクロトランスデューサー法の診断能－乳頭括約筋切開術後の長期予後からの検討－

高畑 俊一、大塚 隆生、田中 雅夫

九州大学 臨床・腫瘍外科

【はじめに】胆嚢摘出術後に器質的異常を伴わないで反復する上腹部痛を来し、診断・治療に苦慮する疾患に乳頭括約筋機能異常(sphincter of Oddi dysfunction: SO dysfunction)があり、乳頭狭窄(SO stenosis)と乳頭括約筋型ジスキネジア(SO dyskinesia)に分類される。SO dysfunctionの診断にはSOの内圧測定(SO manometry: SOM)が広く行われ、基礎圧の異常高値をSO stenosis、その他の異常をSO dyskinesiaとする。SO stenosisの治療としては内視鏡的乳頭括約筋切開術(endoscopic sphincterotomy: EST)が有効であるが、SO dyskinesiaに対するESTの治療効果は一定の見解が得られていない。当科では独自に開発したDouble microtransducer manometry(DMM)による胆道内圧の長時間測定によるSO dyskinesia診断の有用性を報告してきた。

【対象と方法】1994年から2008年までに当科に紹介されたSO dysfunction疑診20症例(男7、女13、平均52.3歳)を対象とした。器質的病変を除外し、morphine-Prostigmin test、SOM、DMMを行った。SOMまたはDMTが陽性の場合にESTを施行し、その予後を追跡した。平均観察期間は92.6ヶ月であった。

【結果】1例ではSOM、DMTいずれも陰性のためEST未実施で症状の改善があり、非SO dysfunctionと考えられた。SOMで基礎圧上昇を認めた6例をSO stenosisと診断しESTを施行した。4例で疼痛改善したが2例では疼痛が持続しSO以外の疼痛発生機序が関与すると思われた。残る13例をSOMあるいはDMMでSO dyskinesiaと診断しESTを行い、10例(77.0%)で疼痛の改善を認めた。ESTが有効であった10例を最終的にSO dyskinesiaとすると、その診断能はSOMで30%であったのに対しDMMでは100%を診断し得た。EST無効で非SODとされた3例を含む13例の正診率は、SOMで38.5%、DMTで76.9%であった。

【まとめ】SO基礎圧以外の異常を示すSO dyskinesiaの診断にはSOMによる判定のみでは不十分であり、長時間測定のもと胆道内圧と疼痛の相関を評価できるDMMが有利であると思われた。DMM診断にも少ないながら偽陽性が存在し、他のパラメーターも含めた評価法の検討が必要であると思われた。

S1-6 巨大伝播性収縮・排便制御における壁在性・外来性神経の役割

柴田 近^{1,2}、染谷 崇徳²、長尾 宗紀²、内藤 剛²、海野 倫明²

¹東北薬科大学病院・消化器外科、²東北大学大学院・生体調節外科

背景：排便時には、結腸に巨大伝播性収縮(giant migrating contractions: GMCs)と呼ばれる収縮波が出現し、GMCsが遠位結腸に達すると排便が起こるため、GMCsは便の急激な移動・排出に関与していると考えられるが、GMCsは排便にとって必須なのかを含め、GMCsの制御機構は不明な点が多い。GMCsと排便制御における壁在性神経と外来性神経の役割を明らかにする目的で以下の検討を行った。

【方法】：成犬を、正常対照群、切離再吻合群(吻合群)、外来神経切離群(除神経群)の3群(各群5頭)に分けた。正常対照群では、strain gauge force transducerを近位(C1)・中部(C2)・遠位(C3)結腸に縫着して結腸運動を測定し、近位結腸内腔にシリコンチューブを留置した。これらの操作に加え、吻合群ではC1とC2の間で結腸を切離・再吻合し、除神経群では結腸に分布する動静脈以外の結合組織を外科的に切離して外来性神経の除神経を行なった。近位結腸内腔にtransient receptor potential (TRP) V1刺激剤のcapsaicin (CAP) 10 mg、TRPA1刺激剤のallyl isothiocyanate (AITC) 10 mgを投与し、GMCsと排便の誘発頻度を検討した。【結果】：正常対照群では、CAP、AITC共に5頭全てでGMCsと排便を誘発した。吻合群では、CAP、AITC投与共にGMCsは1頭のみで、排便はCAP投与で1頭、AITC投与で2頭に認められ、GMCs・排便誘発頻度共に有意に低下した。除神経群では、GMCsはCAP投与で全く誘発されず、AITC投与で2頭のみ認め、GMCsの誘発頻度の低下が認められた。その一方で、除神経群では排便をCAP投与で3頭に、AITC投与で5頭全頭に認め、排便頻度の低下は認められなかった。【結語】：壁在性神経の連続性は、CAP、AITC結腸内投与によるGMCs・排便誘発効果に重要な役割を担っており、外来性神経はGMCsの出現に役割を担っているが、排便の誘発効果には関与していない可能性が示された。

S1-7 尿禁制における排尿筋平滑筋の役割

橋谷 光

名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞生理学分野

膀胱はほとんどの時間を蓄尿に費やす特殊な臓器であり、上部尿路からの尿流入に対しバックプレッシャーを生じないために蓄尿期の膀胱内圧は低圧に維持される必要がある。

いわゆる「括約筋」機能は主として膀胱頸部から近位尿道の平滑筋が担っており、平滑筋の自発収縮をベースに交感神経により筋緊張が維持され、排尿時には交感神経のオフとともに一酸化窒素作動性神経のオンにより筋弛緩を生じる。

膀胱の排尿筋収縮は、副交感神経から放出されるアセチルコリンが排尿筋平滑筋の主にM3受容体に作用して起る。一方、蓄尿時に膀胱内圧を低圧に保つ機構については十分に解明されていない。交感神経性のノルアドレナリンが排尿筋平滑筋の β 受容体に作用して弛緩を生じるとの誤解があるが、膀胱壁の交感神経はほとんどが血管に分布しており排尿筋には分布していないことから起こりえない現象である。

最近、PTHrP(副甲状腺ホルモン関連蛋白)およびPDGFR(血小板由来成長因子受容体) α 陽性細胞という内因性抑制機構の存在が明らかになった。PTHrPは膀胱壁伸展によりおそらく排尿筋平滑筋から放出され、自己分泌により筋収縮を抑制する。PTHrPは自発収縮を強く抑制する一方で神経性収縮に対する抑制作用が弱いことから、排尿時の平滑筋収縮を妨げることなく蓄尿期の収縮性抑制を行うのに合理的である。排尿筋平滑筋には様々な K^+ チャネルが機能的に発現しており、主に大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (BK)チャネルが平滑筋の興奮性抑制を担っていると考えられている。一方、小コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ (SK3)チャネルはPDGFR α 陽性細胞に優位に発現しており、このチャネルはATPによるP2Y1受容体刺激により活性化されることから、蓄尿時の膀胱伸展により尿路上皮から放出されるATPを介した抑制機構としての役割が示唆される。 β 3作動薬は平滑筋弛緩作用により過活動膀胱を改善させるが、 K^+ チャネル開口による過分極の関与については検証を待たねばならない。

S1-8 下部尿路機能に対する副交感神経興奮様薬の作用とその機序について—コリンエステラーゼ阻害薬の作用を中心として—

小原 圭将、茅野 大介、田中 芳夫

東邦大学薬学部薬理学教室

下部尿路機能障害は、膀胱および尿道の機能障害に起因する疾患であり、蓄尿機能障害と排尿機能障害に大別される。蓄尿機能障害である過活動膀胱に対しては、最近、膀胱選択性を有する新しい抗コリン薬や β 3アドレナリン受容体刺激薬が臨床応用されるようになったが、低活動膀胱に伴う排尿機能障害に対しては、コリンエステラーゼ(ChE)阻害薬であるジスチグミン(Dis)やムスカリン受容体刺激薬であるベタネコール(Bet)のような比較的古典的な副交感神経興奮様薬が現在でも臨床的に重要な地位を占めている。

副交感神経興奮様薬が排尿機能障害に対して優れた治療効果を発揮することは、過去の使用実績から明らかであるが、これを支持する実験的根拠は実は必ずしも十分に示されていなかった。そこで、我々は、副交感神経興奮様薬がモルモット下部尿路機能に与える影響やその機序について、*in vitro*および*in vivo*で検討した。その結果、ChE阻害薬であるDisが、蓄尿期には影響を与えずに、排尿時の最大膀胱内圧のみを著明に増強することを見出した。また、Disが、経壁電気刺激により発生する収縮反応のうちアトロピン感受性収縮成分のみを増強すること、尿道内圧には影響を与えないこと、他のChE阻害薬やBetと比較して作用持続時間が著しく長いことを見出し、Disの下部尿路機能に対する作用とその特徴を明らかにしてきた。

今回は、Disの膀胱運動機能の増強効果が長時間に亘る理由をさらに追究したところ、Disは血中から消失した後もその効果が有意に持続し、これがDisのChEに対する結合が強固でwash outされにくいという性質に起因する可能性を示す結果が得られたのでその経緯を報告する。また、副交感神経興奮様薬は、例えば、三環系抗うつ薬などの中枢性疾患治療薬を服用した際に出現する排尿機能障害に対しても用いられることがあるが、今回は、Disがそのように臨床応用される場合も有意な治療効果を発揮する可能性に関する基礎的検討を行ったので、その結果も併せて報告する。

若手の会シンポジウム

YS-1 Rho/Rho-kinaseによるミオシン軽鎖のリン酸化制御システムの解析

河野(金兒) 貴子、鈴木 健二

立命館大学薬学部 生体情報制御学研究室

ミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化は、平滑筋収縮、細胞運動、細胞形態など、さまざまな細胞機能の制御において重要である。MLCのリン酸化は、Rho-kinaseをはじめとするリン酸化酵素とミオシン脱リン酸化酵素の活性バランスによって制御されている。血管平滑筋などにおけるMLCの持続的なリン酸化亢進は、血管攣縮や高血圧症の疾患の原因の1つと考えられている。MLCの持続的なリン酸化は、Rho/Rho-kinaseを介したシグナル伝達経路によって制御されている。しかしながら、上流シグナルであるRhoが一過的にしか活性化されなくてもMLCのリン酸化が持続することが報告されており、MLCのリン酸化が「持続」するメカニズムについては未だ解明されていない。本研究では、数理解析を導入することで、MLCの持続的なリン酸化の制御メカニズムを明らかにすることを目的に解析を行った。

Rho/Rho-kinaseによるMLCのリン酸化制御シグナル伝達経路を微分方程式で表現した数理モデルを用いて、コンピュータシミュレーションや数理解析を行い、MLCの持続的なリン酸化が誘導されるメカニズムの解明を試みた。その結果、①MLCのリン酸化制御システムには、まだ同定されていないミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化フィードバックシグナル伝達経路が存在すること、②ミオシン脱リン酸化酵素の自己活性化によって、Rho/Rho-kinaseによるMLCのリン酸化は双安定性と呼ばれるスイッチのような特徴的な挙動を示すことを理論的に予測した。双安定性は物理学や制御工学の分野では良く知られる性質であり、上流シグナルが閾値を超えると、下流シグナルを不可逆的に切り替えるスイッチのような性質を示す。MLCのリン酸化が双安定性を示すのであれば、上流シグナルであるRho/Rho-kinaseの活性が一過的にでも閾値を超えるとMLCのリン酸化状態がスイッチのように、高い定常状態に切り替わり、持続することが理論的に説明できる。

YS-2 TRPCチャンネルによる末梢循環調節とその治療応用

富田 拓郎¹、島内 司¹、喜多 紗斗美²、岩本 隆宏²、西田 基宏¹

¹自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター心循環シグナル研究部門、

²福岡大学 医学部 薬理学

Peripheral circulatory disturbance is a major clinical outcome of arteriosclerosis obliterans (ASO). Regeneration of microcirculation is essential for recovery from ischemia after vascular occlusion and is regulated by angiogenesis and vessel maturation (arteriogenesis). Although TRPC channels have been known to play critical roles in regulation of vascular tone, their involvement in microvascular network formation is largely unknown. In this study, we have identified critical function of TRPC6 expressed in vascular smooth muscle cell (VSMC) in arteriogenesis. Mice were subjected to femoral artery ligation and the blood flow recovery from limb ischemia was evaluated. VSMC-specific suppression of TRPC6 channel activity increased blood flow recovery and vessel diameter compared to control. We previously reported that TRPC6 is inactivated by endothelium-dependent phosphorylation. One week after hind limb ischemia, phosphorylated TRPC6 level (p-TRPC6) was transiently increased. Administration of cilostazol, an only available drug for ASO, resulted in increased blood flow recovery that was correlated well with sustained increase of p-TRPC6. Therefore, suppression of TRPC6 can be a novel therapeutic strategy for ASO via microvascular regeneration.

YS-3 Na⁺/Ca²⁺交換輸送体の活性制御と血管トーン調節

喜多 紗斗美、岩本 隆宏

福岡大学医学部薬理学

血管平滑筋の収縮・弛緩は、細胞膜や細胞内小器官に発現するCa²⁺輸送蛋白質により形成される細胞内Ca²⁺シグナルによって巧みに制御されている。Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX1)は、イオン濃度勾配と膜電位に依存してNa⁺とCa²⁺を交換輸送する細胞膜トランスポーターであり、血管平滑筋細胞においてNCX1は細胞内からのCa²⁺汲み出し方向に働くと考えられてきた。一方、最近私達は、NCX1遺伝子改変マウスおよびNCX1阻害薬を用いた研究から、NCX1がNa⁺ポンプやNa⁺透過性チャネルなどと共に細胞膜マイクロドメインに集積し、それらが機能共役することによってCa²⁺流入を引き起こすことを見出した。食塩感受性高血圧ではNa⁺ポンプ抑制因子の一つである内因性ウアバインの血中レベルが増加するが、動脈平滑筋のNCX1はNaポンプと機能共役することによりCa²⁺流入方向に働き、高血圧の発症に重要な役割を果すことを報告した。さらに、マウス腸間膜細動脈においてNCX1がTRPC3と機能共役することにより、筋原性およびα₁受容体刺激による細胞内Ca²⁺シグナル形成および血管収縮に重要であることを見出した。また、NCX1あるいはTRPC3高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、冠スパスムに起因する心電図ST上昇および房室ブロックが誘発され、これらはNCX1阻害薬により抑制された。これらの知見により、NCX1は様々な刺激に対してNa⁺依存性のポンプやチャネルと共役し、その組合せによって高次のCa²⁺シグナルを形成して血管収縮を引き起こすことが示された。さらに、NCX1やNa⁺依存性のポンプ・チャネルなどの発現量あるいは活性変化による機能異常が、食塩感受性高血圧や冠スパスムなどの心血管病に関与することが考えられる。

YS-4 重症肺高血圧症モデル動物におけるRhoキナーゼ阻害薬の肺血管拡張効果の検討

阿部 弘太郎¹、鳥羽 慶栄²、岡 正彦³

¹九州大学大学院医学研究院 先端循環制御学講座、²順天堂大学練馬病院 呼吸器内科、

³南アアラバマ大学 薬理学

【背景】肺高血圧症は、血管過収縮とリモデリングにより肺小動脈が狭小化し、肺血管抵抗が上昇する。進行した肺高血圧症において、従来の薬剤に対する肺血管拡張反応は極めて乏しい。したがって、進行した肺高血圧症においては、リモデリングが肺血管狭小化の主たる要因とされている。これまで、われわれは肺高血圧症におけるRhoキナーゼの肺高血圧症における役割について検討してきた。本シンポジウムでは、われわれの発表したヒト肺高血圧症に類似した血行動態とリモデリング病変(中膜肥厚、新生内膜、plexiform lesion)を示す重症肺高血圧症疾患モデルにおけるリモデリング病変と新たな肺血管拡張薬Rhoキナーゼ阻害薬の急性肺血管拡張効果について報告する。

【方法・結果】ラットにVEGF受容体拮抗薬を単回皮下注射し、10%の低酸素で3週間、常酸素で10週間と計13週間飼育する。3週目以降、進行性の高度な肺動脈圧の上昇(右室収縮期圧80-100mmHg)と心拍出量の低下を認めた。病理組織では、3週目から5週目にかけて中膜肥厚と新生内膜が出現し、8週目以降にはplexiform lesionと80%以上の肺小血管に進行性の閉塞性リモデリング病変を認めた。3,5,8,13週目にかけてRhoキナーゼ阻害薬の急性投与を行ったところ、すべての週において同程度

に著明な肺動脈圧の低下を認めた。一方、カルシウム拮抗薬やNO吸入では肺動脈圧の低下を認めなかった。

【総括】Rhoキナーゼ阻害薬が、リモデリングの進行した重症肺高血圧症においても高い肺動脈圧を低下することが明らかになった。この結果は、進行した肺高血圧症において関与が低いとされてきた血管過収縮が、肺血管抵抗上昇に未だ深く寄与していることを示した。従来の肺血管拡張剤で抑制できないRhoキナーゼを標的とした新たな機序に基づく肺血管拡張薬の開発の可能性を示唆した。

YS-5 定型胃切除後の症状出現のメカニズム－術後消化管機能からみた検討－

岩崎 泰三、中田 浩二、古西 英央、川村 雅彦、志田 敦男、矢野 文章、坪井 一人、
三森 教雄、羽生 信義、小村 伸朗、矢永 勝彦

東京慈恵会医科大学 外科学講座

胃切除後にはさまざまな症状が出現し、術後患者のQOLを低下させることが臨床上の問題となる。上部消化管には胃の貯留・排出能の他に、一定量の液体や固形物を受容れる器としての働き(=容量負荷耐性)が存在する。胃切除にともなうこれらの消化管機能の変化は術後の症状出現の要因になると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。

【目的】胃切除後の各症状の出現と消化管機能(貯留・排出能、容量負荷耐性)の関連について検討した。

【方法】Stage II以下の胃癌に対して胃切除が施行され、術後1年以上経過した術後患者51名(全摘R-Y 15名、幽切B-I 17名、幽切R-Y 19名)に、(1) 13C呼吸試験法胃排出能検査〔200kcal/200mlの液状試験食に13C-酢酸100mgを混和し摂取後3時間まで呼吸を採取、Wagner-Nelson法解析で定量的に貯留能(RR5)と排出能(T1/2)を評価〕、(2) 飲水ドリンクテスト(DT)：〔体重[kg] × 10 [ml] の水を約5分間で均等な速度で飲水させ、出現した上腹部症状の強さ(0-3点)と持続時間(0-4点)の和(DT合計スコア=容量負荷耐性)を算出〕、(3) アンケート調査：(a) 逆流、(b) 嘔気、(c) 腹痛、(d) 小胃、(e) 下痢、早期ダンピング〔(f) 全身、(g) 腹部〕、(h) 後期ダンピング症状の出現の有無、を行い比較検討した。

【成績】嘔気および早期ダンピング全身症状の有群においてRR5が有意に小さく貯留能の減少がみられた。また下痢症状有群ではRR5が小さく貯留能の減少傾向がみられた。下痢および早期ダンピング全身症状の有群においてT1/2が有意に短く胃排出の亢進がみられた。早期飽満感および早期ダンピング腹部症状の有群においてDT合計スコアが有意に大きく容量負荷耐性の低下がみられた。

【結論】胃切除後の症状出現には術後消化管機能の変化が影響を及ぼしていると考えられた。術後消化管機能障害を軽減する術式の工夫が望まれる。

YS-6 NERD患者におけるラベプラゾールとイルソグラジンマレイン酸塩の併用効果の検討

中村 淳、鈴木 孝良、峯 徹哉

東海大学医学部消化器内科

【背景】NERD患者には約半数のPPI治療抵抗例が存在する。近年NERD患者の食道粘膜細胞間隙拡大が報告され、その病態解明において注目されているが、細胞間接着に作用するイルソグラジンマレイン酸塩のNERD患者に対する有用性は明らかでない。【目的】今回プラセボを用い、NERD患者に対するイルソグラジンマレイン酸塩のラベプラゾールとの併用効果の有無を検討する。【方法】FSSG(frequency scale for the symptoms of GERD)が8点以上で、上部消化管内視鏡検査にて食道粘膜にびらんなどの粘膜傷害を認めないNERD患者100例を無作為にI群：ラベプラゾール20mg+イルソグラジンマレイン酸塩4mg、P群：ラベプラゾール20mg+プラセボに割り付け4週間投与した。イルソグラジンマレイン酸塩とプラセボはいずれもカプセル化することで二重盲検とした。主要評価項目は4週後の自覚症状の変化とし、FSSGを用いて比較検討した。また、患者QOLはSF-36問診表を用いて評価した。【結果】I群49例(平均年齢51.1±16.4歳、男性13例)、P群48例(平均年齢51.1±14.8歳、男性19例)の計97例が解析対象となった。治療前FSSGは、I群：17.9±7.9、P群：17.7±7.3で有意差はなく、4週後のFSSGはI群：9.0±7.6、P群11.2±8.6で両群とも前値に比し明らかに改善していた(p=0.0001)が、群間での差はなかった。内視鏡所見のLA grade別での検討では、grade N のI群はP群に比しFSSGの有意な改善を認めしたが、grade MのFSSGは両群で差を認めなかった。QOLの比較検討ではI群は、全体的健康感、活力および心の健康にて明らかな改善を認め、P群は全体的健康感および心の健康で改善を認めた(p=0.05)。【結論】ラベプラゾールとイルソグラジンマレイン酸塩との併用効果はLA grade N のNERD患者で明らかであり、QOLの向上にも寄与している可能性が示唆された。

優秀演題賞候補講演

YA-1 ブタ食道体部縦走筋と輪走筋におけるトリプシンの作用とその機序

白 暁鵬¹、田中 義将¹、伊原 栄吉¹、平野 勝也²、平野 真弓³、中村 和彦¹、高柳 涼一¹

¹九州大学大学院医学研究院病態制御内科学、²香川大学医学部自律機能生理学、

³九州大学大学院医学研究院付属心臓血管研究施設分子細胞情報学部門

【背景】胃食道逆流症（GERD）は、胃酸逆流のみならず十二指腸液の非酸逆流も原因となる。すなわち、酸分泌抑制薬であるプロトンポンプ阻害薬（PPI）治療に抵抗する難治性GERDの病態の1つに十二指腸液を代表とする非酸逆流に関連する病態がある。一方、GERDにおける食道粘膜障害の機序の1つに十二指腸液に含まれるトリプシン及びその受容体であるPAR-2の関与が示唆されている。最近、我々はトリプシンが下部食道括約筋（LES）に及ぼす影響及び機序について解明した。しかし、食道体部におけるトリプシンの作用は不明であった。【目的】トリプシンが食道体部輪走筋及び縦走筋の収縮性に及ぼす影響とその機序を解明する。【方法】ブタ食道体部より体部輪走及び縦走平滑筋条片を作成し、トリプシンが食道体部平滑筋に及ぼす影響を、等尺性張力を測定し検討した。【結果】食道体部輪走筋において、トリプシン（100 nM-1 μM）は収縮反応のみを引き起こし、3 μM以上でLES同様に2相性の収縮及び弛緩反応を認めた。しかし、LESで認めた弛緩優位の2相性反応に対し、食道体部では収縮優位の2相性反応であった。またこの反応はtetrodotoxin前処置にて抑制されず、serine protease inhibitor前処置により完全に消失した。トリプシンによる収縮反応はY-27632前処置により部分的に抑制されたが、PD98059及びSB203580前処置にて抑制されなかった。トリプシンによる弛緩反応は、L-NAME前処置の影響を受けなかったが、細胞外液のK⁺濃度を5.9 mM K⁺から40 mM K⁺にすることにより、またはindomethacin前処置により部分的に抑制された。さらに、Y-27632、PD98059及びSB203580前処置により、部分的に抑制された。一方、食道体部縦走筋に対してトリプシンの反応は全く認められなかった。【結語】食道体部輪走筋においてトリプシンは濃度依存性に収縮反応及び2相性収縮弛緩反応を引き起こした。トリプシンによる収縮反応にはRho kinaseが関与し、弛緩反応には、Rho kinase、ERK1/2及びp38MAPKが関与した。さらに、この弛緩反応にはNOは関与せず、K⁺チャネル及びPGI₂の関与が示唆された。トリプシンは、食道体部運動に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

YA-2 セロトニンによるスunks食道平滑筋の収縮反応

椎名 貴彦、内藤 清惟、中森 裕之、志水 泰武

岐阜大学 大学院 連合獣医学研究科 獣医生理学研究室

【背景と目的】セロトニンは、消化管運動を制御する重要な生理活性物質のひとつである。これまでに発表者たちは、嘔吐する小型実験動物であるスunksの食道筋がセロトニンにより収縮することを報告してきた。セロトニンによって引き起こされる収縮反応は、嘔吐に関わる現象であると予想される。本研究では、セロトニンの作用機序について、より詳細に明らかにすることを目的とした。【方法】スunksから摘出した食道標本をオルガンバスにセットし、張力トランスデューサーを用いて機械的反応を記録した。薬物はオルガンバス内の栄養液に適用した。【結果と考察】セロトニンを外部適用したところ、スunks食道標本は縦走方向に収縮した。この反応は、神経および横紋筋の活動を阻害する薬物の存在下でも引き起こされたことから、平滑筋の反応であると考えられる。次に、この収縮反応に関与する受容体サブタイプの同定を行った。5-HT₁および5-HT₂受容体の拮抗薬を前投与しておくこと、セロトニンによる収縮反応は抑制された。また、それぞれの受容体の作動薬を適用することにより、セロトニンを適用した場合と同様の反応が再現された。【結論】以上の結果から、セロトニンはスunks食道の縦走方向運動を制御すること、その制御には5-HT₁および5-HT₂受容体に関与することが明らかとなった。

YA-3 ハムスター前胃平滑筋に対するヒスタミンの収縮効果

長沼 悟、椎名 貴彦、安田 昇平、内藤 清惟、中森 裕之、志水 泰武

岐阜大学大学院 連合獣医学研究科 獣医生理学研究室

【背景および目的】ヒスタミンは、肥満細胞や腸クロム親和性細胞様細胞(Enterochromaffin-like cells: ECL細胞)から分泌される生理活性物質である。ヒスタミンの分泌が高まる時期と胃運動が盛んになる時期は、いずれも食物摂取後であって一致することを考えると、胃平滑筋運動にヒスタミンが何らかの関与をしていることが予想できる。そこで本研究では、ハムスター前胃摘出標本を用いて、ヒスタミンによる前胃平滑筋運動に対する作用を検討した。【方法】シリアンハムスターから前胃を分離した後、マグヌス管に設置した。張力トランスデューサーを用いて、平滑筋の機械反応を記録した。【結果と考察】すべての前胃標本において、自発的な収縮運動が生じた。標本にヒスタミンを外部適用したところ、前胃平滑筋の収縮力の増強と収縮頻度の亢進とが引き起こされた。ヒスタミンが内在神経を介して平滑筋運動に影響している可能性を考え、神経の活動を阻害するテトロドトキシンを用いた。テトロドトキシンが存在しているにもかかわらず、ヒスタミンは胃運動を亢進させたため、ヒスタミンの作用は神経を介さないと考えられる。次に、ヒスタミンの作用に関与する受容体を推定するため、特異的なアゴニストを用いた実験を行った。H₁受容体アゴニストを適用したところ、ヒスタミンと同様に前胃平滑筋の収縮反応の亢進が引き起こされた。しかし、H₂受容体アゴニストでは、ヒスタミンの作用を再現できなかった。【結論】ヒスタミンはH₁受容体を介して前胃平滑筋に作用し、収縮反応を亢進させることが明らかとなった。

YA-4 食虫目スルクス胃におけるモチリンとグレリンによる食後期強収縮制御

伊藤 一真、吉村 真、三上 亮、アヌボン モンダル、坂田 一郎、坂井 貴文

埼玉大学大学院 理工学研究科

我々は以前より食虫目スルクスがモチリンとグレリンを産生し、空腹期にはヒトやイヌと同様の三相より構成される空腹期収縮を起こすこと、および摂食後には律動的な収縮が継続する食後期収縮が観察されることを報告してきた。スルクス胃で食後期終盤に空腹期phase IIIと同等の強収縮を観察したことから、この収縮を仮に食後期強収縮 (Postprandial Giant Contraction, PPGC)と名付け、PPGCとモチリン及びグレリンとの関係が無麻酔、無拘束スルクスを用いて検討した。成体雌雄スルクス(65-100 g)の頸静脈に薬剤投与用のカニューレを留置し、胃体部漿膜表面にフォーストランスデューサーを縫着した。スルクスを絶食し、空腹期収縮運動を確認した後に餌を与えた。その結果、摂食開始直後に胃の収縮様式は空腹期収縮から食後期収縮へ移行し、観察した全例で食後期収縮の最後には約15分間のPPGCが観察された。PPGCと空腹期phase III収縮の運動指数、最大振幅そして持続時間を比較した結果、いずれにおいても有意な差は認められなかった。また、PPGCのピーク時にモチリン受容体アンタゴニストであるMA-2029 (0.1 mg/kg)を投与した結果、PPGCは一時的に抑制されたが、そのうち約80%では、抑制後30分以内にphase III様収縮が観察された。一方、グレリン受容体アンタゴニストであるD-Lys3-GHRP6 (0.6 mg/kg)の投与ではPPGCは完全に抑制され、通常のphase I経過時間後に空腹期収縮へ移行した。以上の結果から、モチリンとグレリンの両方がPPGCの維持に必須であることが示めされた。我々はこれまでに空腹期phase III収縮の惹起と維持にはモチリンとグレリンが必要であるとの結果を得ていることから、PPGCは空腹期phase III収縮と同様の機構によって制御されていると考えられる。さらに、イヌの研究からもPPGCと同様の食後期強収縮が報告されており、モチリン及びグレリンを産生する動物においてPPGCは食後期終了時に胃内を空にするなどの生理学的意義をもっていることが予想される。今後、機能的ディスペプシアなどの消化器疾患の病態とPPGCの関連を検討することは消化器疾患のメカニズムや治療法を考える上で重要であると考えられる。

YA-5 スンクス上部消化管の収縮運動同時測定と十二指腸起源消化管運動

三上 亮、黒田 香百合、伊藤 一真、アムボン モンダル、坂井 貴文、坂田 一郎
埼玉大学大学院 理工学研究科

ヒトやイヌの空腹時には収縮が胃から下部小腸へと伝播する伝播性空腹期収縮運動(MMC)が見られ、約100分間隔の周期でMMCが繰り返される。一方、空腹期収縮は摂食により断続的な食後期収縮へと移行する。イヌでは胃から下部消化管へと伝播する収縮だけではなく、十二指腸を起源とする収縮運動の存在が報告されているがその詳細は明らかになっていない。本研究では、消化管運動小型実験モデル動物であるスンクスを用いて、胃及び十二指腸の消化管運動を同時に測定し、胃と上部小腸の収縮運動の関連とモチリンの作用を検討した。成体雌雄スンクス(65-100 g)の頸静脈に薬剤投与用のカニューレを留置し、胃体部と十二指腸1(胃幽門部から3 cm)、十二指腸2(胃幽門部から6 cm)の漿膜表面にフォーストランスデューサーを縫着し、無麻酔・無拘束下で消化管運動の測定と薬剤投与を行った。本研究ではスンクスでモチリン産生細胞数が多い幽門から6 cmまでを十二指腸とし、十二指腸の収縮で6 g重以上の収縮が見られ、5分間以上連続する一連の収縮群を十二指腸のphase III様収縮と定義した。その結果、胃で起こった自発性Phase III収縮の全例で十二指腸へ伝播する事が観察され、その伝播速度は 6.0 ± 0.18 mm/min十二指腸1と2の間での伝播速度は5.60 mm/minであった。一方、外因性にモチリンを投与した際に観察される胃のPhase III様強収縮の半数で、十二指腸へと伝播しない結果も得られた。また、胃で食後期収縮や空腹期Phase II収縮が観察されている間、十二指腸では不規則収縮と共に断続的な強収縮が高頻度で観察された。この断続的な強収縮が十二指腸でのみで起きている割合は、食後期収縮で93.3 %、空腹期で77.3 %であった。胃の自発性空腹期Phase IIIピーク時へのモチリン受容体アンタゴニストであるMA-2029の投与は胃Phase III収縮を有意に抑制したが、十二指腸のPhase III様強収縮のピーク時へのMA-2029投与では十二指腸収縮抑制効果は認められなかった。これらの結果から、スンクスでは胃とは異なる十二指腸独自の収縮調節機構の存在が考えられた。また、十二指腸起源のPhase III様強収縮の惹起はモチリン非依存的であることが示唆された。

YA-6 演題取り下げ

YA-7 モルモット膀胱排尿筋の自発活動電位に対するK⁺チャンネル開口薬の作用

高木 裕昭、橋谷 光

名古屋市立大学大学院 医学研究科 細胞生理学分野

膀胱の排尿筋平滑筋細胞には各種K⁺チャンネルが発現しており、薬理的阻害実験およびノックアウトマウスを用いた研究により、排尿筋の興奮性と収縮性の制御における役割が明らかにされている。一方、過活動膀胱治療への適用を視野に入れたK⁺チャンネル開口薬の作用の研究も行われてきたが、ほとんどは非生理的な膜電位を有する単離細胞を用いたもので、今日まで組織レベルでの電氣的活動に対する効果は不明である。本研究では、モルモット膀胱排尿筋の組織標本に対するSK、BK、およびK_v7チャンネルの開口薬の作用を、ガラス微小電極を用いた細胞内電位記録法により検討した。

SKチャンネル開口薬であるNS309(10 μM)およびSKA31(10 μM)は、自発活動電位の発生頻度を低下ないし消失させ、過分極を生じた。また活動電位の後過分極は著明に延長したが他の活動電位パラメータは変化しなかった。SKチャンネル遮断薬であるapamin(0.1 μM)の追加投与により、膜電位は静止レベルに戻り活動電位が発生した。

BKチャンネル開口薬であるNS1619(10 μM)により一過性に活動電位の頻度が増加し、後過分極の振幅が減衰した。その後活動電位の頻度は減少ないし消失したが明らかな過分極は生じなかった。BKチャンネル遮断薬であるiberiotoxin(0.1 μM)の追加投与により振幅が大きく持続時間の長い活動電位が出現した。K_v7チャンネル開口薬であるflupirtine(10 μM)は膜電位を変化させずに活動電位を消失させ、K_v7チャンネル遮断薬であるXE991(10 μM)の追加投与により脱分極を生じ、頻度が高く振幅の小さい活動電位が出現した。

阻害薬実験ではBKチャンネル阻害薬が自発活動電位の波形と頻度に対して最も顕著な変化を生じたのに対し、開口薬はいずれも活動電位の頻度を低下させたが特にSK開口薬の活動電位波形に対する効果が大きかった。従って生理的な排尿筋興奮性制御ではBKチャンネルの関与が最も大きく、一方SKチャンネルは通常開いている割合が低く開口薬に対する応答性が高い事が示唆された。

YA-8 IFN-γ/LPSシグナルはInterstitial cells of Cajalのペースメーカー機能を障害する

梶 典幸¹、村田 幸久²、尾崎 博¹、堀 正敏¹

¹東京大学 農学生命科学研究科 獣医薬理、²東京大学 農学生命科学研究科 放射線動物科学

【背景と目的】消化管においてInterstitial cells of Cajal (ICC)は運動のペースメーカー機能を担っている。これまで、炎症性腸疾患や腸閉塞などの炎症病態においてICCの機能障害が報告されているが、どのような炎症性メディエーターがICCペースメーカー機能を障害するか明らかではない。本研究は、マウス小腸筋層から作製したcell clusterを用いて様々な炎症性メディエーターのICC機能に与える影響を検討した。【方法】cell clusterはマウス小腸筋層を細切し、コラゲナーゼ処理することで得た。cell cluster培養48時間後にTh1サイトカイン(IFN-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6, 各25 ng/mL)、Th2サイトカイン(IL-4, 25 ng/mL)、Th17サイトカイン(IL-17, 25 ng/mL)およびLPS(10 μg/mL)を24時間処置した。ICC機能の評価は、ニフェジピン存在下で発生するカルシウムオシレーションの頻度および振幅を指標とした。また、cell clusterの構成細胞を調べるために免疫組織化学染色を実施した。【結果】免疫染色によりcell clusterは平滑筋、ICC、常在性マクロファージ、腸管神経を含んでいることが確認された。Th1、Th2、Th17サイトカインおよびLPSはICC機能に影響を与えなかった。一方、IFN-γとLPSの同時処置(IFN-γ/LPS)はICC機能を有意に抑制した。IFN-γ/LPS処置後にiNOS阻害剤であるL-NAME(300 μM)を処置したが、ICC機能は改善しなかった。対照的に、L-NAMEをIFN-γ/LPSと同時に処置するとIFN-γ/LPSによるICC機能障害は阻止された。【考察】cell clusterは小腸筋層に存在する細胞間ネットワークを保持しており、ICC機能の評価に有用であると考えられた。ICC機能は各種炎症性メディエーターに対して抵抗性を示した。その一方でICC機能はIFN-γ/LPSにより顕著に障害されたことから、感染性炎症などにおいてICCのペースメーカー機能は障害を受けやすい可能性が考えられた。さらにL-NAMEを用いた検討により、このICC機能障害はNOを介しているがcGMP/PKG系の急性応答ではない可能性が考えられた。

YA-9 ウシ毛様体筋におけるフォスファターゼ阻害剤の収縮抑制効果

石田 美織、竹谷 浩介、赤尾 鉄平、宮津 基、高井 章

旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野

毛様体筋は、ムスカリン受容体刺激に対し迅速かつ持続的に収縮する平滑筋である。一般に平滑筋はミオシン等の調節タンパク質のリン酸化によって収縮を調節しているが、毛様体筋においてはそれらの機構はほとんど解明されていない。私たちの従来の研究では、特異的なPP2A阻害剤であるオカダ酸は盲腸ヒモの収縮を抑制するのに対し毛様体筋では収縮を抑制しなかった。

毛様体筋収縮におけるタンパク質リン酸化の役割を探るために、ウシ毛様体筋およびモルモット盲腸ヒモに対するPP2A阻害剤の影響を検討した。

方法：平滑筋の切片をカルバコールで刺激し収縮させて等尺性張力を記録し、3種類のPP2A阻害剤(オカダ酸、Fostriecin、Rubratoxin A)を加えて反応を測定した。

結果：低濃度のオカダ酸とFostriecinは、盲腸ヒモの収縮を抑制したが毛様体筋の収縮は抑制しなかった。Rubratoxin Aは、盲腸ヒモと毛様体筋の収縮をどちらも阻害した。

結論：オカダ酸を含む3種のPP2A阻害剤はいずれも盲腸ヒモの収縮を抑制した。このことはPP2Aがカルバコール誘発性の平滑筋収縮において重要な役割を演じていることを示唆している。一方でオカダ酸とFostriecinは毛様体筋に対しては収縮抑制効果を示さなかった。これは毛様体筋においてはPP2Aの収縮調節への役割が大きい可能性を示すが、一方でRubratoxin Aは毛様体筋の収縮も抑制した。このようなPP2A阻害剤の種類よる反応の違いの理由は未だ明らかではないが、Rubratoxin AのPP2A阻害機序がオカダ酸やFostriecinとは異なる形でPP2Aと他のタンパク質との相互作用に影響を与えたのかもしれない。

一般演題

01-1 各種抗うつ薬によるモルモット膀胱平滑筋の収縮抑制効果の検討

宇野 準二^{1,2}、川端 由香¹、辻 香澄¹、野村 恵子¹、小原 圭将¹、茅野 大介¹、吉尾 隆³、
田中 芳夫¹

¹東邦大学 薬学部 薬理学教室、²桶狭間病院 藤田こころケアセンター、

³東邦大学 薬学部 医療薬学教育センター 臨床薬学研究室

【背景・目的】近年、うつ病性障害の患者数が著しく増加している。この精神疾患に対しては、新規抗うつ薬(SSRI：選択的セロトニン再取り込み阻害薬、SNRI：セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬、NaSSA：ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性抗うつ薬)が数多く登場したことにより、患者の症状により適した治療薬の選択が可能となりつつある。また、SSRIやSNRIは、三環系・四環抗うつ薬と比較すると、抗コリン作用が軽減されているといわれている。しかしながら、抗コリン作用に起因すると考えられる尿排出機能障害という視点からみた場合、現在臨床応用されている抗うつ薬がどの程度この下部尿路機能障害を誘発しうる可能性があるかについては、薬物横断的な吟味が必ずしも十分とはいえない。本研究では、モルモット膀胱平滑筋の収縮反応に対する抑制効果を比較検討することで、この疑問点の解明を試みた。

【方法】モルモットから摘出した膀胱の排尿筋標本を作製し、アセチルコリン(ACh)の濃度反応曲線に対する各種抗うつ薬の影響を検討した。

【結果】古典的な三環系抗うつ薬であるクロミプラミン、トリミプラミン、アミトリプチリン、ノルトリプチリンおよびNaSSAのミルタザピン(3×10^{-7} - 10^{-5} M)は、AChの濃度反応曲線を濃度依存的に右方に移動させた。また、その他の三環系抗うつ薬、四環系抗うつ薬、SSRI、SNRIの一部も高濃度領域において、AChによる収縮反応を抑制した。一方、非三環系抗うつ薬であるトラゾドン、SSRIのフルボキサミン、エシタロプラムおよびSNRIのミルナシプラン(3×10^{-7} - 10^{-5} M)は、AChの濃度反応曲線に対して顕著な影響を与えなかった。

【考察】他の抗うつ薬に比べて、古典的な三環系抗うつ薬およびNaSSAは、抗コリン作用に起因する尿排出機能障害を引き起こす可能性が高く、トラゾドン、フルボキサミン、エシタロプラム、ミルナシプランは、その可能性が少ないことが示唆された。

01-2 The age-related changes in the venules of the mouse bladder suburothelium

ラム ミシェル、橋谷 光

名古屋市立大学 大学院医学研究科 細胞生理学学科

Venules are reinforced with a network of spontaneously contractile pericytes; however, aging can affect the properties of pericytes leading to structurally compromised venules. Consequentially, blood can stagnate and accumulate harmful metabolic waste that exacerbates vascular instability. This study explores the effect aging may have on the vasculature of the mouse bladder suburothelium and whether these changes can influence bladder function. Micturition in young (6 weeks old) and older mice (8 months old) was briefly examined using laminated pre-treated filter paper. Histological changes to vessels of the suburothelium were observed using immunohistochemistry while the functional properties of pericytes were investigated using Ca^{2+} imaging and intracellular recording. Ca^{2+} transients from venular pericytes of the bladder suburothelium occurred 2.7 ± 0.5 times per min at an amplitude of $0.1 \pm 0.1F_i/F_0$ with a half-amplitude duration of $0.2 \pm 0.02s$ ($n=5$). Similarly, spontaneous electrical activity recorded from venules occurred approximately $3.9 \pm 0.2min^{-1}$ at an amplitude of $14.9 \pm 2.3mV$ ($n=4$). These mice urinated 0.57 times with a mean urine volume of $79.9 \mu L$ in the space of an hour ($n=10$). Preliminary comparisons indicate older mice urinate at least 3 times more (2/hr) and produce a significantly greater mean volume of $997.6 \mu L$ ($P < 0.05$, $n=3$). Suburothelial venules of the older mice exhibited faster spontaneous Ca^{2+} transients occurring $5.1 \pm 0.8min^{-1}$ but with a smaller amplitude of $0.1 \pm 0.04F_i/F_0$. Desmin-positive pericyte coverage in venules and capillaries was greater in older mice. The age-related changes to the properties of spontaneous activity in the suburothelial microvasculature likely contributes to the emergence of OAB.

01-3 ブタ膀胱平滑筋収縮の好氣的代謝への依存性について

永井 雄太、金田 剛治、神田 秀憲、浦川 紀元、清水 一政

日本獣生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医薬理学研究室

平滑筋も、骨格筋や心筋同様に低酸素やエネルギー基質の欠乏により収縮は影響を受けるがその変化は臓器、組織により異なる。収縮の好氣的代謝への依存度は大動脈や気管平滑筋では低く、腸管平滑筋などでは高いことが知られている。一方、膀胱平滑筋(US)はモルモットにおいて高濃度 K^+ 収縮はシアン化合物により顕著に抑制され、その収縮は好氣的代謝に依存するが、一方、ラットでは低酸素状態はカルバコール刺激下のATP含量および酸素消費量の顕著に抑制したが、収縮反応の低下はわずかであり、収縮反応の好氣的代謝への依存度が低いことが報告されている。これらのことから、低酸素によるUSの収縮反応の変化は種差あるいは刺激により異なることが考えられる。【目的】本研究はブタUSの高濃度 K^+ による収縮の好氣的代謝への依存性について検討した。【方法】ブタ膀胱は屠畜場より入手した。張力実験は張力トランスジューサーを用いて等尺性に測定記録した。還元型ピリジンスクレオチド(PNred)蛍光は蛍光光度計を用いて行った。またPCrとATP含量の測定はHPLC法にて行った。【成績】1) 高浸透圧性に適用した65mM KCl($H-65K^+$)は、USにおいて一過性とそれに続く持続性収縮を示した。栄養液中のグルコース除去は、 $H-65K^+$ による一過性および持続性収縮に有意な変化を示さなかったが、窒素通気による低酸素状態は、 $H-65K^+$ 収縮の持続性相を顕著に抑制した。2) USにおいて $H-65K^+$ の適用は、解糖系活性を示すPNred蛍光の持続的な増加を示した。グルコース除去は、 $H-65K^+$ によるPNred蛍光の増加をわずかに抑制した。窒素通気は、 $H-65K^+$ によるPNred蛍光増加をさらに増強した。3) グルコース除去は、 $H-65K^+$ 存在下でのPCrおよびATP含量には有意な変化を示さなかったが、窒素通気は、PCrおよびATP含量を有意に抑制した。【結論】以上より、ブタUSの高濃度 K^+ による収縮は好氣的代謝に依存すること、また栄養液中のグルコース除去下では代償性に内因性の基質が収縮維持に作用する可能性が示唆された。

01-4 尿道平滑筋の蓄尿時における張力維持機構の解明—尿道平滑筋のカルシウムセンサーを探る—

梶岡 俊一、林 摩耶、高橋 良輔、内藤 誠二

九州大学大学院 医学研究院 泌尿器科学

【背景と目的】と蓄尿時に尿道は収縮し尿禁制を保っている。生理機能においてみると、収縮が99.9%の時間占有をしているという非常に特徴的な平滑筋組織である。この特徴的な持続収縮力を維持する機構と細胞外 Ca^{2+} 濃度を感知するメカニズムに関連があるのではないかと仮説をたて、尿道平滑筋のカルシウムセンサーを探ることとした。【材料と方法】雌ブタ膀胱排尿筋、雌ブタ尿道平滑筋(輪状筋)、等尺性収縮張力測定法、膜脱膜化標本、リアルタイムPCR法【結果】膀胱排尿筋では細胞外 Ca^{2+} 濃度(0-5mM)を変化させても張力に変化はなかったが、尿道平滑筋では細胞外の Ca^{2+} 濃度に対して濃度依存的に収縮張力が増加した。 α -toxin脱膜化標本を用いた実験ではいずれも細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的に収縮張力が増加し、 EC_{50} は膀胱排尿筋で0.9 μ M、尿道平滑筋で1.1 μ Mであった。尿道平滑筋において、細胞外 Ca^{2+} 濃度5mMの収縮反応に対して La^{3+} 、 Gd^{3+} を加えた場合も変化は認めなかった。また、 Mg^{2+} で張力を惹起することはできなかった。カルシウムセンシングレセプター(CaSR)の選択的アゴニストであるR568、及び選択的アンタゴニストであるNPS2143は細胞外 Ca^{2+} による収縮に影響を及ぼさなかったが、SKF-96365、及びcyclopiazonic acid (CPA)は、この収縮を濃度依存的に抑制した。リアルタイムPCR法では、CaSR及び Ca^{2+} を感知すると言われていたTRPC1, C3, C4, C6 channelの発現量を検討したところ、CaSR及びTRPC6 channelに関しては、有意な差は認めなかったが排尿筋では、TRPC4 channelが、尿道平滑筋ではTRPC1, TRPC3 channelが圧倒的に有意に発現しているという特徴的な局在を示した。

【結語】尿道平滑筋の新たな生理機能の見解を、カルシウムセンサーの観点から見いだすことができた。この細胞外 Ca^{2+} の感受性における、排尿筋との決定的な違いと尿道平滑筋におけるカルシウムセンサーとしてのTRP channelのサブタイプの特徴的な局在性をさらに検討することで、腹圧性尿失禁などの病態の解決につながることを期待される。

01-5 ドコサヘキサエン酸(DHA)による気管平滑筋の収縮抑制作用の可能性の検討

西岡 菜々子、黒木 孝太、佐藤 恭輔、金井 啓祐、小原 圭将、茅野 大介、
田中 芳夫

東邦大学 薬学部 薬理学教室

【背景・目的】我々は、 ω -3系多価不飽和脂肪酸(PUFA)に分類されるドコサヘキサエン酸(DHA)の血管に対する作用を検討し、DHAがTXA₂受容体(TP受容体)アゴニストによってもたらされるラットの動脈や腸間膜動脈の収縮反応を著明に抑制することを見出し、この作用がDHAの循環保護効果の一端を担う可能性を示した。一方、TXA₂は、血管平滑筋のみならず気管平滑筋にも作用してこれを強力に収縮させる内因性因子でもあり、TP受容体遮断薬やTXA合成酵素阻害薬は気管支ぜん息に対する長期管理薬として臨床で使用されている。本研究では、DHAが気管平滑筋でもTP受容体刺激を介した収縮反応を抑制するか否かを明らかにすることで、この ω -3系PUFAが気管支ぜん息に対して予防・改善効果を発揮する可能性を検討した。【方法】モルモットから摘出した気管組織のリング標本作製し、各種収縮刺激による収縮反応に対するDHAの影響を検討した。【結果】1)DHAは、U-46619(TXA₂安定誘導体)とPGF_{2 α} による収縮に対して、これらがほぼ最大収縮反応を誘発する濃度を用いた場合は有意な抑制を示さなかった。一方、最大収縮の30-60%の収縮を誘発する濃度を用いた場合は、これを強く抑制した。2)DHAは、U-46619とPGF_{2 α} の濃度反応曲線を抑制した。3)DHAは、U-46619とPGF_{2 α} による収縮反応を抑制する濃度を用いても、アセチルコリン(ACh)やヒスタミン(His)の濃度反応曲線にはほとんど影響を与えなかった。【考察】DHAは、気管平滑筋組織においても、プロスタノイド受容体を介した収縮を非プロスタノイド受容体を介した収縮と比較してより著明に抑制することが明らかとなり、この ω -3系PUFAが気管支ぜん息に対して予防・改善効果を発揮する可能性が示唆された。

02-1 マウス回腸切離吻合術後の肉芽組織深部における5-HT₄受容体活性化による移植神経幹細胞からの腸壁内神経系再生・新生促進作用

後藤 桂¹、川原 勲¹、鍋倉 淳一²、國安 弘基¹、高木 都¹

¹奈良県立医科大学 医学部 医学科 分子病理学講座、

²自然科学研究機構 生理学研究所 発達生理学研究室 生体恒常機能発達機構研究部門

【目的】我々はこれまでに、5-HT₄受容体作動薬クエン酸モサブリド(以下MOS)は下部消化管切離吻合術後に損傷した壁内神経系の再生・新生促進作用を有することを見いだしている。さらに、壁内神経細胞が蛍光標識された遺伝子改変マウスおよび2光子顕微鏡を用いたin vivoイメージング法により、MOSの損傷腸壁内神経系の再生・新生効果について定量的に解析することができた。本研究では、再生・新生した神経細胞の起原を明らかにするために細胞移植実験を行い同様のin vivoイメージングを行った。【方法】thyl promoter YFP H-line mouseをNembutal麻醉下にて回腸切離吻合術を施行後、C57BL/6 マウス胎児の海馬と脳室下帯由来神経幹細胞をPKH26蛍光色素でマーキングして尾静脈から移植を行った。このマウスにMOS 100 μ Mを2週間飲水投与して飼育後に再度麻醉下にて開腹し吻合部のin vivoイメージングを実施した (n=4)。免疫組織学的解析のためイメージングを実施した個体と同様の処理を行った個体 (n=4)から採取した組織の吻合部を含む縦切り凍結切片標本作製し、まずYFPの緑色蛍光とPKH26の赤色蛍光を観察し撮像後、抗PGP 9.5抗体による免疫染色を実施して撮像し三者を比較検討した。【結果】in vivoイメージングにより、吻合部の結び目付近で緑色蛍光を示す細胞と赤色蛍光を示す細胞(ネットワーク)が観察された。前者は、内在性の神経幹細胞から分化した新生神経細胞で、後者は移植した神経幹細胞から分化した新生神経細胞と思われる。免疫組織化学的解析の結果、PGP9.5陽性神経節はPKH26蛍光陽性細胞とYFP緑色蛍光陽性細胞の両者から構成されており血流を介して移植した神経幹細胞は内在性の神経幹細胞と同様に肉芽組織深部で神経細胞に分化している事が認められた。【結論】MOSは小腸においても神経幹細胞からの損傷腸壁内神経系の再生・新生に促進作用を示すことが明らかとなった。

02-2 ドパミンは脊髄排便中枢に作用してラット大腸運動を促進する

志水 泰武¹、池田 あずさ^{1,2}、古江 秀昌²、井本 敬二²、中森 裕之¹、内藤 清惟¹、
椎名 貴彦¹

¹岐阜大学 大学院 連合獣医学研究科 獣医生理学研究室、

²生理学研究所 神経シグナル研究部門

【背景と目的】大腸運動は、内在神経系および中枢神経系の両者によって厳密に制御されている。ドパミン作動性神経が障害されるパーキンソン病では、高確率で便秘が起こることから、大腸運動制御へのドパミンの関与が示唆されている。消化管内在神経系におけるドパミンの作用は明らかになりつつあるものの、中枢神経系における作用については不明な点が多い。そこで、本研究では、中枢神経、特に脊髄排便中枢に着目し、脊髄を介した大腸運動に対するドパミンの作用を明らかにすることを目的とした。【材料と方法】麻酔下のラットの遠位結腸と肛門にカニューレを設置した。カニューレを介して、大腸内腔圧の変化と、蠕動運動によって肛門側へ推送される液量を測定することで、*in vivo*における大腸運動を評価した。【結果】排便中枢が存在する腰仙部脊髄腔内にドパミンを投与すると、大腸内腔圧変化の頻度及び振幅が増加し、大腸内腔液が肛門側へ送り出された。このようなドパミンによる大腸運動の亢進作用は、D2様受容体アンタゴニストを前処置することにより消失した。また、D2様受容体アゴニストの投与により、ドパミンと同様の大腸運動の亢進が再現された。これらの結果から、ドパミンは脊髄排便中枢に作用し、大腸運動を亢進させること、その作用はD2様受容体を介していることが示唆された。次に、本研究で明らかとなったドパミンによる大腸運動の亢進と、すでに知られているグレリンによって誘発される大腸運動の亢進が同一の経路を介した反応であるかを検討した。脱感作により、グレリンの作用が発揮できない状態でも、ドパミンによって大腸運動の亢進が起こった。また、ドパミンの作用を阻害した状態でも、グレリンによって大腸運動が亢進した。これは、グレリンとドパミンの間には直接的な相互作用がなく、ドパミンによる大腸運動の亢進はグレリンとは異なる機序で起こることを示唆している。【結論】本研究によって、ドパミンはD2様受容体を介して脊髄排便中枢に作用し、大腸運動の制御機構に関与していることが明らかとなった。

02-3 マウス盲腸においてc-Kitを発現する平滑筋細胞

飯野 哲、堀口 和秀

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

消化管筋層においてc-Kit(CD119)はカハール介在細胞(Interstitial cells of Cajal, ICC)と肥満細胞に発現し、両細胞の特異的なマーカー分子であり、かつ発生分化に関与する分子であることが知られている。特にカハール介在細胞においては平滑筋細胞と明確に区別するマーカーである。一方、胎生期消化管においてカハール介在細胞と平滑筋細胞の共通前駆細胞にc-Kitが発現し、その後c-Kit発現を失った平滑筋細胞が分化成熟する。カハール介在細胞と平滑筋細胞は発生学的に共通の起源を持つが、成熟した細胞では異なる表現型を示すことが知られている。今回私たちは成体マウスの盲腸においてc-Kitを発現し、かつ平滑筋の特徴を持つ細胞を同定した。盲腸輪走筋の最内層に位置するほぼ1層の細胞はc-Kit免疫陽性を示し、加えてカハール介在細胞の別のマーカーであるTMEM16A(Anoctamin1)も発現した。さらに同細胞は平滑筋マーカーである α 平滑筋アクチンと平滑筋ミオシン重鎖を発現した。同細胞周囲には神経要素は少なかった。c-Kit-EGFPマウスの盲腸筋層においてもEGFP発現細胞が輪走筋最内層に観察され、かつ同細胞には α 平滑筋アクチンと平滑筋ミオシン重鎖が発現した。c-kit変異を持つW/W^vマウス盲腸ではカハール介在細胞は発生せず欠損するが、輪走筋最内層ではc-Kit発現細胞が観察された。電子顕微鏡観察によると輪走筋最内層に位置する細胞は輪走筋平滑筋よりも平たい細胞体を持ち、薄い細胞質突起を長くのばしていた。細胞構造としては太いおよび細いフィラメント、カベオラを持ち、数は少ないがギャップ結合を有し、形態学的には成熟した平滑筋細胞の特徴を示した。これらから今回同定した細胞はカハール介在細胞のマーカーであるc-KitとTMEM16Aを発現する特殊な平滑筋細胞であると考えられた。同細胞は1層ほどの細胞層として神経と関係なく位置していることから、盲腸輪走筋運動への関与は無いと考えられる。今後、同細胞の機能的意義について検討する必要がある。

02-4 機能的合胞体平滑筋活動のリアルタイム磁界計測:磁気直線的MIデバイス仕様の グラジオ磁界センサー研究

中山 晋介¹、内山 剛²

¹名古屋大学 医学部 細胞生理学、²名古屋大学 工学部 電子情報デバイス

多くの平滑筋組織では、平滑筋細胞が集団となり機能的合胞体として活動することが知られる。そのために細胞間は電氣的に結合しており、興奮性電流の伝搬により連携活動を発揮する。特に消化管においては、平滑筋組織の連動による分節運動や蠕動運動が重要な機能であり、正常な活動には細胞間の密接な電氣的連携が必須である。細胞組織としての電氣的な振る舞いを、その組織内電流伝搬によって発生する磁界として検出できれば、興奮性細胞組織の機能評価が可能となる。超伝導量子干渉素子(Superconducting Quantum Interference Device: SQUID)による神経組織などの磁界計測が試みられてきた。しかしながら、電気刺激と同期した信号積算により発生磁界が計測されているが、自発性興奮に伴う磁界計測は、これまでに成されていない。本研究では、磁気直線の磁気インピーダンス(magnetoimpedance: MI)素子を検出器として使用することにより、磁界信号の高精度な2チャンネル差動増幅器を構築し、数十から数百ピコテスラレベルの高感度・安定な細胞組織磁界計測を可能とした。モルモット小腸から摘出した筋層標本において、約1mm直下に設置された磁気検出器は、数百ピコから数ナノテスラの活動磁界をリアルタイム計測した。この磁界活動はKチャンネル阻害剤投与により顕著に増幅し、一方、検出器との隔絶距離を増すことで大きく減弱した。また、小腸筋層標本の方向を検出器に対し逆にする、磁界活動の方向(正負)が逆転した。この結果は、小腸平滑筋組織を機能的合胞体として活動させるための組織内を伝搬する電流を検出している。細胞組織における磁界発生機構をシミュレーションと共に考察し、高感度磁界計測機器の応用についても言及したい。

03-1 術前診断に難渋した下大静脈原発平滑筋肉腫の一切除例

園田 洋史¹、南村 圭亮¹、入江 彰一¹、小林 隆¹、平田 泰¹、真船 健一¹、
森 正也²

¹社会福祉法人 三井記念病院 消化器外科、²社会福祉法人 三井記念病院 病理診断科

症例は、慢性腎不全で血液維持透析施行中の76歳男性で、右下腹部痛を主訴に来院。腹部エコーで右腎上極に40mm大の腫瘤を指摘された。腹部造影CTでは、右副腎部に局在する40mm大の腫瘤性病変で、分葉状で内部石灰化を伴い、境界不明瞭な病変であった。動脈相では肝実質と同時期に周囲より濃染し、肝細胞相ではwash outされた。腹部MRIでは、T1強調像で肝より低信号、T2強調像で等信号を呈していた。ソナゾイドを用いた腹部エコー検査では、肝S6と腫瘤との境界は不明瞭であった。悪性疾患を否定できず、エコーガイド下生検を施行したところ、腫瘍は巨大核や多核を伴った異型性の強い紡錘形細胞より構成されていた。免疫染色では α -smooth muscle actinおよびdesminが陽性であり、CD34は軽度陽性、S-100(-)、c-kit(-)、CD31(-)であることから平滑筋肉腫と診断された。外科的切除の方針となり、右第8肋間開胸開腹連続斜切開でアプローチした。腫瘍は肝S6、右副腎、下大静脈と境界不明瞭であるため、肝S6部分切除、右副腎合併切除、下大静脈合併切除を行い、腫瘍を摘出した。術後の病理診断では下大静脈原発の平滑筋肉腫と診断された。今回われわれは術前原発巣の診断に難渋した、極めて稀な下大静脈原発の平滑筋肉腫の一切除例を経験したので文献的考察をあわせて報告する。

03-2 モルモット腸間膜動脈内皮細胞が細胞容積を保つ機序について

山本 喜通^{1,2}、高野 博充²

¹名古屋市立大学 看護学部 生理学、²名古屋市立大学大学院 医学研究科 細胞生理学

血管内皮細胞は厚さ数 μm の非常に薄い細胞で、その容積は極めて限られ、それを一定に保つことは重要である。これまで我々は急性単離したモルモット腸間膜動脈内皮細胞層標本に conventional whole-cell clamp 法を適用する場合、細胞外液には NaCl を主体とした pH7.3 の溶液を使い、細胞内液にはより生理的な環境を目指し、KCl の大部分を K-aspartate によって置換した中性 (pH6.9 at 30°C) の低 Cl 液を使用していた。この両液は等張になるよう調整した。ただ、パッチが維持できるのは 20 分程であった。パッチが壊れるのは細胞の形態変化による可能性があるが、この標本は単層の多細胞標本で、パッチされた細胞の形態変化は顕微鏡像で観察するだけでははっきりしなかった。そこで顕微鏡像をビデオ撮影して時間を縮めて再生すると細胞が膨化することが分かった。そこでこの細胞膨化を防ぐ実験条件を検討した。ピペット内への -20cmH₂O までの静水圧付加、細胞内液の 3% 低張化、細胞内液 pH7.3、細胞内液 aspartate を Cl で置換 (細胞内外の Cl 濃度はほぼ等しい、pH は 6.9) といった条件では細胞膨化を阻止できなかったが、細胞内液を KCl 主体の pH7.3 の液とすると細胞膨化は起きず、パッチも 1 時間以上維持することが可能となった。細胞内外に内向きの Cl 濃度勾配があると水を伴った Cl 流入が起きるために細胞が膨化すると考えられる。また、Cl 濃度勾配がない条件でも細胞内 pH が 6.9 では細胞が膨化したが、細胞外液 pH を 7.7 として pH 勾配を作っても細胞内 pH が 7.3 では細胞は膨化しなかったため、絶対的な細胞内 pH が細胞容積維持には重要であることが分かった。一般的には細胞内 pH を下げると細胞内タンパク質の負電荷が減少するので、それを補うために水を伴った Cl 流入が起きると説明されているが、細胞内液がタンパク質を含まないピペット内液で置換された条件下での低 pH が細胞膨化を起こす機序については今後の課題である。

03-3 マウス門脈平滑筋細胞の Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ チャンネルを担う TMEM16A の機能発現

山村 寿男、大城 隼也、佐伯 尚紀、鈴木 良明、今泉 祐治

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

Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ (Cl_{Ca}) チャンネルは、[Ca²⁺]_i の上昇によって活性化し、平滑筋の収縮や神経伝達、上皮性分泌などの基本的な生理機能に関与している。血管平滑筋において、Cl_{Ca} チャンネルの活性化は、静止膜電位を脱分極側へシフトさせるため、血管筋緊張の増大をもたらす重要な要素である。近年、TMEM16 遺伝子ファミリーに属する TMEM16A が、様々な平滑筋に発現する Cl_{Ca} チャンネルの分子実体として報告された。本研究では、マウス門脈平滑筋細胞に発現する TMEM16 ファミリーの発現解析と機能解析を行った。リアルタイム PCR 法および細胞免疫染色法による発現解析の結果、門脈平滑筋細胞に TMEM16A の発現が認められた。門脈平滑筋細胞にホールセルパッチクランプ法を適用し、細胞内 pCa 6.0 の環境下で Cl_{Ca} チャンネル電流を測定した。脱分極刺激によって活性化する外向き電流と再分極によって惹起される内向き末尾電流が観察された。これらの電流は、Cl_{Ca} チャンネルの阻害薬であるニフルミ酸や T16A_{inh}-01 によって有意に抑制された。次に、門脈平滑筋から TMEM16A をクローニングしたところ、スプライスバリエントの abc 体と acd 体が大部分を占めた。abc 体と acd 体を HEK293 細胞に発現させて、Cl_{Ca} チャンネル電流を観察したところ、末尾電流の時定数 (>100 ms) は、門脈平滑筋細胞の時定数 (55 ms) よりも大きかった。そこで、門脈平滑筋細胞をアクチン骨格の重合阻害剤であるサイトカラシン D で前処置したところ、その時定数は有意に延長した (85 ms)。さらに、TMEM16A 分子の多量体形成について、全反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いて FRET 解析した。TMEM16A のスプライスバリエント体は、ホモもしくはヘテロ二量体でチャンネル 1 分子を構成することが示された。本研究によって、マウス門脈平滑筋細胞では、主に TMEM16A (abc) と TMEM16A (acd) のホモもしくはヘテロ二量体で機能的 Cl_{Ca} チャンネルを形成していることが明らかとなった。また、Cl_{Ca} チャンネル活性は、アクチン骨格によって制御されていることも示唆された。以上の研究成果は、血管平滑筋に機能発現する Cl_{Ca} チャンネルの生理機能を解明する上で重要な知見になると考えられる。

03-4 糖尿病時の血管弛緩機能障害に対するGRK2の関与と性差について

飛田 麻里、田口 久美子、松本 貴之、小林 恒雄

星薬科大学 薬学部 創薬科学科 機能形態学研究室

【目的】我々は以前に2型糖尿病モデルマウスにおける胸部大動脈においてGRK2増加による血管弛緩反応の減弱を報告している。多くの疾患が生物学的性差により発症・進展することが明らかとなりつつあるが、心血管疾患も例外ではない。そこで今回我々は、2型糖尿病マウス胸部大動脈におけるGRK2の関与と性差について検討を行った。【方法】雌雄それぞれICRマウスにストレプトゾトシンおよびニコチンアミドを処置した実験的2型糖尿病モデルマウス及び対照の雌雄ICRマウス(対照群)より、胸部大動脈を摘出し、クロニジン誘発血管弛緩反応およびGRK2タンパクの局在を検討した。【結果】 α_2 体作動薬であるクロニジン誘発血管弛緩反応およびそのシグナル伝達経路(Akt/eNOS経路)活性は、糖尿病時、雄において減弱しているが、雌では対照群と変化が認められなかった。雄性糖尿病病態では、1) GRK2発現・活性に有意な上昇を認め、それに伴って細胞膜へのGRK2移行も確認された。2) GRK2阻害薬投与によりクロニジン誘発血管弛緩反応が改善された。一方、雌性糖尿病病態では、GRK2発現に差は認められなかった。更に、 α_2 受容体は持続的な刺激により脱感作を起こすことが知られているが、クロニジンによる繰り返し刺激に対して、対照雄性群では徐々に血管弛緩反応性が減弱していくが、雌では全く変化を認めなかった。しかし、糖尿病病態時には、雌雄共に、繰り返し刺激により反応性の減弱が認められ、GRK2阻害薬処置により是正された。【考察】雄性の糖尿病時には、GRK2活性の増加に伴って、血管弛緩機能が低下するが、雌性においては、GRK2活性の増加は生じず、内在性GRK2阻害因子の存在により血管弛緩機能が保護されていることが示唆される。今回の結果は、糖尿病時における性差に関わるメカニズムを示すと共に、糖尿病性血管障害のための有力な分子標的薬開発に繋がること期待される。

03-5 肺高血圧症で機能亢進するCa²⁺感受性受容体はジヒドロピリジン系Ca²⁺チャネルブロッカーによって活性化する

山村 彩^{1,2}、平工 明里¹、堀井 千裕¹、塚本 喜久雄¹、小崎 康子¹、大原 直樹¹、
ゆえん じえいそん²

¹金城学院大学 薬学部、²イリノイ大学シカゴ校 医学部

肺高血圧症は、肺血管の攣縮や肺血管壁の肥厚による血管内腔の狭小化、血栓形成による肺血管抵抗の上昇によって、持続的に肺動脈圧が上昇する致死性疾患である。このため、本邦では特定疾患治療研究事業対象疾患(難病)に指定されている。これまでに細胞内Ca²⁺シグナル機構の異常など複数の肺高血圧発症因子が同定されているが、それらが複雑に関連しているため、未だに正確な発症メカニズムは解明されていない。最近、我々は、細胞外Ca²⁺濃度を感知するCa²⁺感受性受容体(CaSR)が特発性肺動脈性高血圧症(IPAH)患者由来の肺動脈平滑筋細胞(PASMCs)に高発現し、その機能亢進が肺高血圧症の病態に関与していることを明らかにした。また、臨床的知見として、肺高血圧症患者の殆どがジヒドロピリジン系Ca²⁺チャネルブロッカーに抵抗性を示すノンレスポonderであり、場合によっては、その病態が悪化する。本研究では、IPAH-PASMCsで発現増加しているCaSRに対するCa²⁺チャネルブロッカーの影響を検討した。ニフェジピンの投与によって、IPAH-PASMCsの[Ca²⁺]_{cyt}は濃度依存的に増大した(EC₅₀ = 0.21 μ M)。外液Ca²⁺濃度が0 mMの場合では、ニフェジピン誘発性の[Ca²⁺]_{cyt}上昇は低下した。また、CaSRの選択的阻害薬であるNPS2143存在下においても、ニフェジピン誘発性の[Ca²⁺]_{cyt}上昇は低下した。一方、対照群(Normal)および慢性血栓性肺高血圧症(CTEPH)患者由来PASMCsの[Ca²⁺]_{cyt}にニフェジピンは無効だった。ジヒドロピリジン系であるニカルジピンやBay K 8644もニフェジピンと同様のCa²⁺応答を示したが、非ジヒドロピリジン系であるジルチアゼムやベラパミルは影響を与えなかった。IPAH-PASMCsにおけるニフェジピン誘発性[Ca²⁺]_{cyt}上昇は、CaSRのsiRNAノックダウンにより減少した。一方で、Normal-PASMCsにCaSRを高発現させると、ニフェジピン誘発性[Ca²⁺]_{cyt}上昇が観察されるようになった。本研究による知見は、ジヒドロピリジン系Ca²⁺チャネルブロッカーが肺高血圧症で発現亢進したCaSRを活性化するために、この薬剤が肺高血圧症に有効でないことを科学的に裏付ける結果として考えられる。

04-1 p122RhoGAPを過剰発現させた遺伝子改変マウスでは冠攣縮が引き起こされる

金城 貴彦¹、田中 真実²、長内 智宏¹、奥村 謙¹

¹弘前大学 医学部 循環呼吸腎臓内科、²弘前大学 医学部 高血圧・脳卒中内科学講座

【背景と目的】冠攣縮性狭心症は器質的狭窄のない冠動脈が一過性に攣縮することによって引き起こされる狭心症である。近年では冠攣縮が急性冠症候群の発症に関与することや、致死性不整脈、院外心肺停止と関連することなどが示されているが、冠攣縮の原因は未だ明らかにされていない。これまで我々は冠攣縮性狭心症患者の皮膚線維芽細胞のPhospholipase C (PLC) - δ 1 活性が約3倍亢進しており、男性の1割ではPLC - δ 1 遺伝子の257番目のアミノ酸であるアルギニンのヒスチジンへの変異(R257H)が証明され、その活性は、野生型と比べ有意に亢進していることを証明した。さらにマウス血管平滑筋にヒト変異型PLC - δ 1を血管平滑筋特異的に過剰発現させた遺伝子改変マウスではエルゴメトリン投与により冠攣縮が引き起こされることを報告してきた。一方、我々は冠攣縮性狭心症患者の皮膚線維芽細胞ではPLC - δ 1の活性化因子であるp122RhoGAP/START-GAP/DLC-1 (以下 p122)が過剰発現していることも報告した。今回我々はp122遺伝子導入マウスを作製し、冠攣縮が引き起こされるか検討した。【方法】C57BL/6系統マウスに α -smooth muscle actinをプロモーターとしてp122を導入し、トランスジェニックマウス(TG)を作製した。野生型(WT)およびTGの大動脈でのp122の発現を比較した。さらに、体表面心電図モニター下にWTおよびTGに経静脈的にエルゴメトリンを投与し心電図変化の有無を検討した。【結果】WTおよびTGから採取した大動脈からRNAを抽出し、TGではp122のmRNA発現が亢進していることをReal-Time PCR法で確認した。同様にウェスタンブロット法で、TGの大動脈検体ではWTよりp122発現量が多いことを確認した。体表面心電図モニター下で、経静脈的にエルゴメトリン(50 mg/kg)を投与したところ、TGではST上昇が認められWTではそれらの変化は認められなかった(3/3 vs 0/5, $p < 0.05$)。さらにTGではPQ延長(2例)や房室解離(1例)を示す個体もあった。【結語】p122遺伝子導入マウスは血管平滑筋におけるp122の発現が亢進し、エルゴメトリンにより冠攣縮が引き起こされ、冠攣縮性狭心症のモデルマウスと考えられた。

04-2 ラット膝窩動脈と静脈の収縮に関する α_1 アドレナリン受容体サブタイプ

大塚 亮^{1,2}、柴山 靖¹、梶栗 潤子¹、伊藤 猛雄¹

¹名古屋市立大学大学院 医学研究科 薬理学、²Human Alignment とんぼ

【目的】下肢血管の平滑筋細胞に存在する α_1 アドレナリン(α_1 -AR)受容体サブタイプの機能変化と下肢循環不全との関連は不明である。これらを明らかにするため、ラット内皮除去膝窩動脈および静脈における α_1 -ARアゴニストであるフェニレフリン(PE)収縮に対する選択的 α_1 -ARサブタイプ受容体拮抗薬の効果を検討した。【方法】実験には、8-10週齢のWistar系雄性ラットの膝窩動脈および静脈の内皮除去輪状標本を作成し、95% O₂+5% CO₂で通気したグアナネチジン(5 μ M)とジクロフェナク(3 μ M)を含む37℃に保温したクレブス液中で、等尺性張力を測定した。まず、過剰K⁺(70 mM)による収縮を測定した。次に、PE(10⁻⁸-10⁻⁵ M)の濃度依存性収縮に対する5-methylurapidil(α_{1A} -AR選択的拮抗薬: 5-MU)、L-765,314(α_{1B} -AR選択的拮抗薬)、BMY7378(α_{1D} -AR選択的拮抗薬)の効果を検討した。【結果】70 mM K⁺とPE(10⁻⁸-10⁻⁵ M)は膝窩動脈と膝窩静脈をともに収縮させ、その発生張力は膝窩動脈>膝窩静脈であった。5-MUは、膝窩動脈のPE収縮を抑制したが、膝窩静脈のPE収縮に影響を与えなかった。また、L-765,314は、膝窩動脈のPE収縮に影響を与えなかったが、膝窩静脈のPE収縮を抑制した。一方、BMY7378は、膝窩動脈と膝窩静脈のPE収縮をともに抑制した。【考察】ラット膝窩動脈平滑筋のPE収縮は α_{1A} -ARと α_{1D} -ARの活性化により、一方、ラット膝窩静脈平滑筋のPE収縮は α_{1B} -ARと α_{1D} -ARの活性化によることが明らかになった。

04-3 糖尿病モデルラット頸動脈における血管弛緩反応減弱と血中マイクロパーティクルについて

田口 久美子、松本 貴之、小林 恒雄

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学研究室

【目的】糖尿病性血管機能障害は、心血管疾患発症および進展における初期イベントである。血中のマイクロパーティクル(MP)は、様々な種類の細胞から放出された小さな細胞膜断片から成る粒子であり、近年、MPが血管内皮細胞からの一酸化窒素(NO)放出を破綻させ、その後に血管を変性させることにより血管機能障害を引き起こすかもしれないことが示唆されているが、その詳細な機序は明らかとなっていない。そこで今回我々は、糖尿病モデルラットより採取した血中MPがラット頸動脈の血管弛緩反応におよぼす影響について検討を行った。【方法】ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラット(STZ群)およびその対照ラット(Control群)より血中MPを採取した。それぞれ採取したMPをラット頸動脈よりリング標本に処置し、ACh誘発血管弛緩反応を観察した。さらに、その関連タンパクの発現を検討することで、そのメカニズムについて解析した。一方で、採取したMPについては、ドットプロット法を用いることで、その性状を確認した。【結果】頸動脈におけるACh誘発血管弛緩反応は、STZ群で有意に減弱した。STZ群およびControl群より採取したMPからはCD62P(MPマーカー)が発現していたことから、採取物がMPであることを確認した。頸動脈リング標本にSTZ群およびControl群より採取したMPを24時間器官培養した結果、STZ群のMPを処置したリング標本においてACh誘発血管弛緩反応の減弱が認められ、処置した血管においてNO合成酵素(eNOS)発現は減少し、カベオリン-1発現の増加が観察された。【考察】STZ誘発糖尿病ラットより採取した血中MPは、頸動脈における血管弛緩機能障害を生じることを初めて明らかにした。更に糖尿病時のMPは、eNOS発現の低下やカベオリン-1発現の増加を制御することを示唆した。今回の結果は、血中のMPが糖尿病性血管機能障害を発症・進展させる際に重要な役割を果たし、病態およびその進行に関与するバイオマーカーである可能性を示唆する。

04-4 モルモット肝静脈の収縮機序

高野 博充、橋谷 光

名古屋市立大学 大学院 医学研究科 細胞生理学分野

肝臓は血液の貯蔵部位としてはたらくも持つ一方で、その血管抵抗の増加によって静脈還流量の減少を引き起こすというはたらくも指摘されているが、肝臓内に分布する血管の収縮メカニズムは明らかになっていない。そこで今回我々は出口側の抵抗を司る肝静脈の収縮機構について検討した。標本としてモルモット肝臓の右葉から剥離した肝静脈ストリップ標本を作製し、神経刺激およびアゴニスト刺激に対する張力の変化を測定した。標本に経壁神経刺激(持続時間 50 μ s、頻度 3 - 100Hz、1sec)をすると、刺激頻度依存的に一過性の収縮を観察した。この反応はTetrodotoxin (3 μ M)存在下では見られなくなった。この収縮は、Phentolamine (3 μ M)によって抑制され、Propranolol (3 μ M)を追加投与すると増加した。50Hz以上の頻度の刺激ではAtropine (3 μ M)感受性の収縮成分がみられるようになった。NG-nitro-L-arginine(100 μ M)では有意な変化は見られなかった。これらの収縮反応はニフェジピン(1 μ M)では変化せず、CPA(10 μ M)やY-27632(10 μ M)によって抑制された。Phenylephrine (1 - 10 μ M)またはAcetylcholine (1-10 μ M)はいずれも濃度依存的に収縮を引き起こした。これら両アゴニストによる収縮反応もY-27632により50%抑制された。以上の結果より、モルモット肝静脈は興奮性の神経支配を受けており、それは主にアドレナリン作動性で、一部コリン作動性のものが含まれることが分かった。その収縮メカニズムに電位依存性LタイプCa²⁺チャネルの関与は小さく、筋小胞体からのCa²⁺放出機構とROK経路を介する信号伝達経路が主であると考えられた。

04-5 アクチン・ストレスファイバー形成における、新規シグナル分子パキシリンと活性型Fynチロシンキナーゼとの相互作用の重要性

張 影、岸 博子、宮成 健司、木村 友彦、高柿 了大、呂 博超、小林 誠

山口大学 大学院医学系研究科 生体機能分子制御学

Rhoキナーゼ(ROK)を介するアクチン・ストレスファイバー形成は、細胞形態や細胞遊走の制御において、主要な役割を果たしている。以前、我々は、ストレスファイバー形成の細胞内シグナル伝達経路の中で、ROKの上流の新規シグナル分子としてFynチロシンキナーゼを発見した。さらに、活性型および非活性型Fynの突然変異体を作製し、これらのプルダウンアッセイと機能プロテオミクスにより、FynとROKの間に介在する、活性型Fyn下流の新規分子としてパキシリンを見出した。しかしながら、Fynとパキシリンの相互作用の詳細、およびストレスファイバー形成におけるパキシリン自身およびパキシリン/Fyn相互作用の重要性、については不明なままであった。そこで、本研究では、まず、パキシリンの全長およびフラグメントのリコンビナント蛋白を作成し、それらとFynリコンビナント蛋白との直接の分子間相互作用を、表面プラズモン共鳴法を用いて解析した。その結果、活性型Fynは、パキシリンの全長およびN末端に直接結合したが、C末端には結合しなかった。非活性型Fynは、いずれのパキシリンとも直接結合しなかった。免疫染色において、活性型FynはパキシリンのN末端と細胞内で共局在した。更に、パキシリンのN末端の過剰発現により、ストレスファイバー形成が著明に抑制された。また、パキシリンのノックダウンにより、ROK活性化とストレスファイバー形成が著明に阻害されたが、その後続けて、パキシリン全長を再発現させると、ストレスファイバー形成はレスキューされたのに対して、パキシリンのフラグメントの再発現ではレスキューされなかった。抗パキシリン抗体あるいは抗Fyn抗体を用いた免疫沈降実験では、ストレスファイバー形成の刺激を加えた細胞内において、両分子間の相互作用が増強することが示された。以上の結果より、パキシリンはストレスファイバー形成のFyn下流シグナル分子として、そのN末端において、活性化されたFynと結合することによって、ストレスファイバー形成を制御する重要な役割を果たすことが示唆された。

05-1 モルモット下大静脈におけるアセチルコリンの収縮機構

佐藤 玲、高野 博充、橋谷 光

名古屋市立大学大学院医学研究科・医学部 細胞生理学分野

静脈は容量血管として循環制御に関わるが、動脈に比べその収縮機構は十分に解明されていない。本研究では静脈還流調節において重要な役割を果たす下大静脈の神経性および液性収縮機構について検討した。モルモット胸部下大静脈からリング標本作製、37°C加温酸素化クレブスで灌流下に等尺性張力測定を行い、薬物は灌流液中に溶解して投与した。内皮除去実験では、機械的に内皮細胞を剥離した標本を用いた。モルモット下大静脈は経壁神経刺激やフェニレフリン(10 μ M)およびノルアドレナリン(10 μ M)では収縮を生じなかったが、ACh(1-10 μ M)により濃度依存性の収縮を生じた。ACh収縮はニフェジピン(10 μ M)により36%、Ca²⁺除去(nominally Ca²⁺-free)溶液により50%抑制された。ACh収縮はY23187(10 μ M)により40%抑制され、Nifedipine(10 μ M)存在下におけるY23187(10 μ M)の追加投与により32%に抑制された。ニフェジピン(10 μ M)存在下において、CPA(10 μ M)により基線張力の上昇が起り、ACh収縮は徐々に減弱して38%まで抑制されたが、カフェイン(10mM)の単独投与では収縮を生じなかった。ニトロアルギニン(L-NA、10 μ M)は基線張力の増加を生じ、L-NA存在下でのACh収縮は280%増加した。また内皮細胞除去標本においてもACh収縮の増大を認めた。モルモット下大静脈は交感神経刺激に応答せずAChにより収縮を生じる特性を有する。ACh収縮には電位依存性L型カルシウムチャンネルを介する細胞外カルシウム流入、Rhoキナーゼ依存性のカルシウム感受性増加および小胞体カルシウム遊離が関与していると考えられた。AChによる小胞体カルシウム遊離はおそらくIP₃受容体を介しており、リアノジン受容体の関与はないと考えられた。また内皮細胞はバックグラウンドにNO遊離を介して収縮を抑制しており、ACh収縮は内皮依存性弛緩と平滑筋細胞に対する収縮作用のバランスにより決定されると考えられた。

05-2 モルモット脛骨微小血管の加齢による機能形態変化

福田 裕康、三井 烈、高野 博充、橋谷 光

名古屋市立大学大学院 医学研究科 細胞生理学

【背景】骨粗鬆症における骨代謝異常の背景には「血管の老化」の一面としての骨循環障害の関与が推測される。骨膜に存在する微小血管は骨組織の血流調節に関わると考えられるが、その収縮制御機構は明らかではない。本研究では骨膜微小血管の年齢に依存した機能形態的变化を検討した。

【方法】3週齢および12ヶ月齢モルモット脛骨より微小血管を含む骨膜組織標本を作成し、血管壁追跡ビデオシステム(DIAMTRAK)を用いて血管径の変化を経時的に計測し、自発活動、神経性収縮の性質を比較した。また免疫組織化学染色により微小血管の平滑筋構築および神経支配について検討を行った。

【結果】3週齢、12ヶ月齢モルモットいずれの骨膜組織標本においても、 α 平滑筋アクチン陽性の血管平滑筋が輪状に配列する動脈(10 μ m~30 μ m)と非紡錘形の壁細胞が分布する静脈が識別された。動脈においては自発収縮を生じる血管も観察されたが、12ヶ月齢モルモットでは自発収縮の自発パターンが多様であった。自発収縮の有無に関わらず経壁神経刺激により収縮を生じたが、神経性収縮は3週齢に比べ12ヶ月齢モルモットにおいて減弱していた。神経性収縮はフェントラミンにより消失し、ニトリアルギニンにした増強するが、12ヶ月齢モルモットではその増強作用が増大していた。また12ヶ月齢モルモットにおいてはニトリアルギニン投与により収縮を生じ、自発収縮が誘発された。免疫組織化学染色により、3週齢、12ヶ月齢モルモットともに微小血管に沿って交感神経マーカーであるtyrosin hydroxylase陽性神経線維およびサブスタンスP陽性神経線維が観察されたが、NO陽性神経線維は観察されなかった。またvWFとeNOSはいずれも血管内皮層での局在が観察された。

【考察】12ヶ月齢モルモット骨膜細動脈において交感神経性収縮が減弱し、NO産生阻害により自発および交感神経性収縮が増強されたことから、加齢による内皮依存性NO放出の増強が示唆された。

05-3 SPC/Fyn/ROK経路による血管平滑筋収縮Ca²⁺感受性亢進のシグナル伝達における、FynおよびROK活性化の経時的変化の検討

岸 博子、張 影、宮成 健司、木村 友彦、高柿 了大、呂 博超、小林 誠

山口大学 大学院医学系研究科 器官制御医学講座 生体機能分子制御学

Rhoキナーゼ(ROK)を介した血管平滑筋収縮のCa²⁺感受性亢進は、血管攣縮を引き起こす血管平滑筋異常収縮において、重要な役割を果たす。これまでに我々は、血管平滑筋収縮のCa²⁺感受性亢進の原因分子として、sphingosylphosphorylcholine (SPC)を見出した。更に、SPCの下流でROKを活性化する新規の異常収縮シグナル分子として、Src Family tyrosine kinase (Src-TK)の1種であるFynを同定した。本研究では、ヒト冠状動脈平滑筋細胞における、SPC刺激時のFynとROK活性化の経時的変化について検討した。Fynの活性化は、細胞溶解液を抗Fyn抗体で免疫沈降した後、自己リン酸化部位に対する抗体によるウエスタンブロット解析で検討した。ROKの活性化は、標的分子であるmyosin phosphatase targeting subunit 1のリン酸化に対する抗体によるウエスタンブロット解析で検討した。SPC刺激後5 minでFynは活性化されたが、同じSrc-TKに属するc-srcの活性化はみられなかった。また、Fynの活性はSPC刺激後5 min以降徐々に低下したが、ROKの活性はSPC刺激後30 minにわたって増加した。以上の結果より、SPC/Fyn/ROK経路による血管平滑筋収縮Ca²⁺感受性亢進のシグナル伝達において、Fynの活性化は一過性である一方、ROKの活性化は持続的である事が示唆された。

05-4 ラット胃粘膜下細静脈の自動能に関する検討

三井 烈、橋谷 光

名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞生理学分野

【背景】膀胱、遠位結腸および胃の粘膜下細静脈は周期的な自発収縮を発生するが、こうした細静脈の自動能は、持続的な伸展を受ける臓器における微小循環のうっ血を防ぐ機構であると考えられる。本研究では、ラット胃の粘膜下細静脈の自発収縮に関して(1)内皮から放出されるNOの関与と、(2)近年報告されたCa²⁺-activated Cl⁻ channel(CaCC)であるTMEM16A(Anoctamin 1)の関与について検討した。

【方法】胃粘膜下層標本を作製し、自発収縮による血管径の変化を経時的血管壁追跡ビデオシステムにより記録し、NOSやTMEM16Aの発現については免疫組織化学的に検討した。【結果】胃粘膜下細静脈では毎分4回程度の周期的な自発収縮が認められ、NO合成阻害剤(100 μM L-NA)により自発収縮頻度は上昇した。NOの放出源を調べるために免疫染色を行った結果、nNOS陽性の神経線維は細静脈周囲には分布しておらず、eNOSの発現が細静脈内皮に確認された。また1 μMアセチルコリンの投与によりNO依存性(L-NAによって抑制される)の弛緩反応が認められた。一方、CaCCの抑制(100 μM niflumic acidまたは100 μM DIDS)により、細静脈自発収縮の消失ないし頻度の減少がみられた。TMEM16A抑制剤とされているT16Ainh-A01(1 μM)も自発収縮を停止させ、細静脈を弛緩させた。しかし免疫染色では胃粘膜下層標本内にTMEM16A陽性の細胞が観察されなかった。TMEM16A抗体の有効性は、胃の筋層内に存在するinterstitial cells of Cajalの陽性反応によって確認した。【結論】胃粘膜下細静脈の自発収縮頻度は、内皮から持続的に放出されるNOにより抑制されていると考えられた。T16Ainh-A01による自発収縮の抑制効果は、TMEM16A以外のCaCCなどに作用した結果である可能性が考えられた。

06-1 ミオシンII阻害薬による平滑筋弛緩促進のメカニズム

渡辺 賢

首都大学東京 人間健康科学研究科

平滑筋は、骨格筋に比べミオシン II 阻害薬 blebbistatin 感受性が低く、収縮抑制が起こりにくいと考えられてきた。しかし、収縮抑制程度は弱いにせよ、平滑筋においても blebbistatin は10 μM以下でアクトミオシン ATPase 活性、収縮張力を抑制するとともに、収縮フィラメント配列を攪乱した(Watanabe et al. Am J Physiol Cell Physiol 298 : C1118-26, 2010)。更に、スキンド盲腸紐 Caイオン活性化収縮後の弛緩経過に与える blebbistatin および速筋型骨格筋への選択性が高いミオシン II 阻害薬 N-benzyl-p-toluenesulfonamide (BTS)が有意に弛緩を促進すること、その弛緩促進効果が Caイオン除去後約 30 秒で出現することを、第54回及び第55回日本平滑筋学会総会で報告した。弛緩経過の回帰分析より、blebbistatin は活性化クロスブリッジ解離後のラッチ形成を抑制すると共に、ラッチ解離を促進することが明らかになった。これらの弛緩促進効果は、人工細胞内液からATPを除去した場合には全く観察されないことから、ミオシンII阻害薬はミオシン頭部のヌクレオチド結合部位にヌクレオチドが結合した状態に作用してミオシン構造を変化させることでミオシンフィラメントの空間的配置を攪乱させ、ラッチ形成抑制とそれからの解離促進を示すことが示唆される。

06-2 2型糖尿病モデルラット頸動脈におけるセロトニンによる収縮反応性の検討

渡邊 駿、松本 貴之、田口 久美子、小林 恒雄

星薬科大学 医薬品化学研究所 機能形態学

【目的】セロトニン (5-HT) は強力な血管収縮因子であり、高血圧や動脈硬化といった生活習慣病を始め種々の疾患において重要な役割を果たすことが知られている。また、糖尿病及び糖尿病性合併症の発症・進展において、5-HT系の関与が様々な臓器・組織で報告され、5-HTシグナルのシステムティックな理解が糖尿病治療において重要であると考えられる。血管においては、様々な疾患において、動脈における5-HTによる機能の変化が報告されている。しかしながら、慢性2型糖尿病における5-HTによる反応性に関しての詳細は不明である。そこで、2型糖尿病モデル (Goto-Kakizaki; GK) ラット頸動脈を用いて、5-HTの収縮反応性に関して検討を行った。さらに、5-HTの代謝系及びRho kinaseの関与について検討を行った。【方法】42-46週齢の雄性GKラット及び対照のWistarラット (Wis) より、頸動脈リング標本を作製して血管収縮反応を測定した。また、monoamine oxidase A (MAO-A), serotonin transporter (SERT), 5-HT_{2A}受容体発現をwestern blot法にて検討した。【結果および考察】5-HTによる収縮反応は、内皮細胞の有無にかかわらず、Wis群と比較してGK群にて増大していた。一方、受容体に依存しないKClによる収縮反応は、両群で同程度であった。内皮除去標本において、SERT阻害薬処置により、5-HTによる収縮反応は両群共に増大した。また、5-HTを代謝する酵素 (MAO-A) の阻害薬処置による5-HT収縮に対する影響は認められなかった。5-HT_{2A}agonistによる収縮反応はWis群と比較してGK群にて増大していた。MAO-A, SERT, 5-HT_{2A}受容体発現は両群で変化が認められなかった。さらに、内皮除去標本における5-HT収縮に対してRho kinase阻害薬を処置すると両群収縮が抑制され、その反応に差が認められなくなった。以上の結果から、GKラット頸動脈においては5-HT収縮が増大しこれには平滑筋におけるSERT活性あるいは、5-HT_{2A}受容体活性化以降の機構が関与している可能性が示唆された。平滑筋細胞でのRho kinase活性経路が5-HT収縮増大に関与していることが示唆された。

06-3 ウシ毛様体筋細胞の高純度調製法の検討

宮津 基、高井 章

旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野

【目的】毛様体平滑筋は副交感神経支配下で協調的な収縮応答を示し、その収縮持続相における細胞外からのCa²⁺補充経路としてM₃型ムスカリン受容体を介して活性化される2種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35 pS)とNSCCS (100 fS)] が主要な役割を果たすことを単離した毛様体平滑筋を用いて明らかにしてきた。一方、毛様体の筋組織切片を免疫組織染色法で観察すると、 α -アクチン陽性の平滑筋細胞とは別に、黒色のメラニン細胞様細胞、 α -アクチン陰性の線維芽様細胞の少なくとも3種類の細胞が豊富に存在することがわかり、組織全体から抽出した遺伝子および蛋白質は毛様体平滑筋とは異なる細胞由来のものを多く含んでいると考えられる。今回、毛様体平滑筋に特異的に発現する遺伝子や蛋白質を評価するための細胞調製法について、密度勾配遠心法を用いて検討した。

【方法】コラゲナーゼ酵素処理で分散したウシ毛様体組織試料をPercoll密度勾配により分離した。分離した細胞の評価はFluo-4蛍光法による細胞内Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i)の測定と、抗 α -アクチン抗体による免疫蛍光顕微鏡法を使用した。

【結果と考察】3層のPercoll密度勾配(1.050, 1.060, 1.082)中に分散した細胞を重層し遠心すると、メラニン細胞様細胞は密度1.082の下層に、その他の細胞は1.082と1.060の界面、1.060と1.050の界面に主に分布した。この2界面に存在する細胞を回収し、カルバコール(CCh)に対する[Ca²⁺]_i変化を測定すると、約70%の細胞が一過性のCa²⁺上昇を示した。また、免疫蛍光顕微鏡法により抗 α -アクチン抗体を用いて観察すると α -アクチン陽性細胞が大多数を占めることがわかった。これらの結果から、Percoll密度勾配法により1回の調製で10⁶コのオーダの毛様体平滑筋細胞を分離できることがわかった。今後、試料の純度を更に高め、例えばマイクロアレイ法を用いることにより、毛様体平滑筋細胞の網羅的遺伝子発現を解析できると期待される。

06-4 虹彩括約筋における高濃度K⁺およびカルバコール収縮の好氣的代謝への依存度

神田 秀憲¹、金田 剛治¹、余戸 拓也²、原田 恭治²、原 康²、浦川 紀元¹、
清水 一政¹

¹日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医薬理学研究室、

²日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医外科学研究室

眼球において酸素は網膜および虹彩の血管から、あるいは角膜から供給される。ウサギの呼吸ガスを低酸素状態にすると、眼房水内の酸素分圧が約50%低下する。これは虹彩平滑筋が生体において好氣的環境に暴露されていることを示唆する。しかし、虹彩平滑筋の収縮と好氣的代謝の関係については未だ明らかではない。本研究はブタ虹彩平滑筋の高濃度K⁺およびカルバコール(CCh)誘発性収縮に対して、シアン化ナトリウムの添加もしくは低酸素条件下で、収縮張力および酸素消費量の変化の測定を行い、虹彩平滑筋における収縮変化と好氣的代謝の関連性について調べた。張力はマグヌス法により等尺性に記録した。酸素消費量はクラーク電極型生物酸素モニターを用いて測定した。1)ブタ虹彩括約筋において高浸透圧性に65mM KCl (H-65 K⁺)を適用すると、一過性とそれに続く持続性の収縮張力の発生と、それに伴う酸素消費量の増加を示した。また、CCh(0.3および1.0 μM)は濃度依存性に収縮張力を発生し、それに伴う酸素消費量の増加を示した。2)H-65 K⁺誘発性収縮は、窒素通気による低酸素条件下ではほぼ消失し、また、NaCN(100 μMおよび1mM)適用により濃度依存性に抑制された。また、同様にCCh誘発性収縮は低酸素条件下ではほぼ消失し、NaCNにより濃度依存性に抑制された。3)H-65 K⁺誘発性の酸素消費量の増加は、NaCN(100 μMおよび1mM)により濃度依存性に低下した。同様にCCh誘発性の酸素消費量の増加はNaCNにより濃度依存性に低下した。4)HPLC法により、H-65 K⁺存在下においてNaCN(1mM)は、ホスホクレアチン(PCr)含量を有意に減少した。また、CCh存在下においても、NaCNは、PCr含量を有意に減少した。以上を要するに、ブタ虹彩括約筋において、高濃度K⁺およびCCh誘発性収縮は低酸素条件下あるいはNaCNの適用で酸素消費量およびPCr含量の低下を伴って抑制したことから、これらの収縮張力の発生は好氣的代謝への依存度が高いことが示唆された。

07-1 STIM1のリン酸化による貯蔵部作動性カルシウム流入の制御

平野 勝也¹、平野 真弓²

¹香川大学 医学部 自律機能生理学、²九州大学 医学研究院 分子細胞情報学

【目的】貯蔵部Ca²⁺の減少により活性化されるCa²⁺流入経路は、すべての細胞に共通に認められる普遍的なCa²⁺シグナル発生機構である。STIM1およびSTIM2が貯蔵Ca²⁺量のセンサー蛋白質として、Orail~3が流入チャンネル蛋白質として機能する。脱リン酸化酵素を阻害するとSTIM1はリン酸化されることが報告されている。本研究では、貯蔵部Ca²⁺流入の調節におけるSTIM1リン酸化の役割を明らかにする。【方法】HeLa細胞を用いてFura-2蛍光測定を行った。貯蔵部作動性Ca²⁺流入の活性化にはタブシガルギンを用いた。Phos-tag SDS-PAGE法によりSTIM1のリン酸化を解析した。STIM1領域欠損および部位特異的変異体を用いて、リン酸化部位と貯蔵部作動性Ca²⁺流入に及ぼす影響を評価した。【結果】細胞外Ca²⁺を除去し、タブシガルギン刺激を行うと一過性に細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)が上昇した。[Ca²⁺]_iが刺激前値に戻った後、細胞外Ca²⁺を再添加すると持続的な[Ca²⁺]_i上昇が発生した。RNA干渉法によりSTIM1の発現を抑制すると、持続的[Ca²⁺]_i上昇だけが抑制された。細胞外Ca²⁺がない条件下、タブシガルギン刺激を行うとSTIM1はリン酸化された。このリン酸化は細胞外Ca²⁺を再添加しても持続して観察された。アミノ酸領域646-685を欠損させるとタブシガルギンによるリン酸化が消失した。この領域の中でリン酸化を受ける可能性のある残基は、S660、T675、S667、S668であった。4残基すべてをAに置換したSTIM1変異体を発現する細胞では、タブシガルギンが引き起こすCa²⁺流入が阻害された。4残基のうち1残基でもリン酸化可能に残しておく、野生型と同様のCa²⁺流入が観察された。【結論】貯蔵部作動性にSTIM1はC末端領域646-685でリン酸化される。この領域のリン酸化は貯蔵部作動性Ca²⁺流入に必要である。

07-2 坐骨神経の慢性絞扼により足底動脈収縮刺激応答性は亢進する

石田 裕丈、古川 琢麻、齊藤 真也、石川 智久

静岡県立大学薬学部・薬学研究院

【目的】坐骨神経損傷による神経障害性疼痛時に、患足側足底部の血流障害が発生することは知られているが、疼痛との因果関係はおろか、血流障害の発生機序も明らかとなっていない。そこで、本研究では絞扼性坐骨神経損傷(CCI)モデルラットの足底部摘出血管を用いて、血管収縮応答性の亢進発生機序を解析した。【方法】7週齢のwistar系雄性ラットの坐骨神経をブレイドシルクで絞扼し、手術4週間後の11週齢ラットの患足側足底動脈と正常足側のそれを単離し、約2mm幅のリング標本を作製した。標本に2本のタングステンワイヤーを通してトランスデューサーとホルダーに固定して等尺性収縮を測定した。【結果】ノルアドレナリンとU46619の濃度反応曲線(CRC)は正常足側に比べて患足側では低濃度側にシフトした。ノルアドレナリンの累積投与において、VDCC阻害薬nifedipine、Rho kinase阻害薬H-1152を作用させた。CRCの最大反応はどちらの条件でも患足側、正常足側で抑制された。さらに、nifedipine、H-1152を同時に処置することでnon-VDCCを介した細胞内Ca²⁺濃度を検討したが、依然として患足側のCRCsは低濃度側にシフトしていた。次にH-1152、 α 受容体阻害薬phentolamine、neuropeptide Y₁受容体阻害薬BIBP3226、ATP受容体阻害薬PPADS存在下でKClの累積投与を行った。有意差は無いものの、患足において収縮の低濃度側へのシフトが見られた。次に、Ca²⁺ ionophoreであるA23187存在下で、Ca²⁺の累積投与を行った。正常足、患足どちらも収縮が生じたが、そのCRCの最大反応は患足側で有意に増強されていた。この最大収縮に対して、H-1152を作用させると、正常足側では完全に収縮が抑制されたが、患足側では収縮が残存した。【考察】従来CCIによる収縮反応性の亢進は α_1 受容体数の増加によるものと解釈されてきた。今回、我々の実験からは α_1 受容体刺激だけではなく様々な刺激に対して、また様々なCa流入経路を介した刺激に対して応答性が亢進していることがわかった。

07-3 血管内皮細胞におけるTRPM7発現・機能の亢進がもたらす血管障害の可能性

平石 敬三、倉原 (海)琳、西村 美保、洪 錫欽、井上 隆司

福岡大学 医学部 生理学

血管内皮細胞は、血管の最内層にある細胞で、血管の健康状態を維持するのに重要な役割を果たしている。血管内皮細胞は一酸化窒素(NO)やエンドセリンなど数多くの血管作動性物質を放出し、血管壁の収縮・弛緩をはじめとして、血管壁への炎症細胞の接着、血管透過性、凝固・線溶系の調節などを行っている。我々は様々な物理化学刺激によって活性化されるTransient receptor potential (TRP)チャネルファミリーに着目して、血管内皮の機能調節作用について検討を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いたマイクロアレイおよびリアルタイムRT-PCRの結果から、HUVECに発現が観察される14種類のTRPファミリーのうち、TRPM7チャネルのmRNA発現量が最も多いことが明らかになった。TRPM7は非選択性の陽イオンチャネルであり、哺乳類細胞におけるマグネシウム(Mg²⁺)の受動的な流入経路として知られている。HUVEC細胞を用いたTRPM7のノックダウン(RNA干渉)やTRPM7阻害薬FTY720はendothelial nitric oxide synthase (eNOS)およびエストロゲン受容体(ER α)の発現を増加させた。一方、細胞外液のMg²⁺の増加はHUVECのTRPM7のタンパク発現量を有意に抑制した。抗酸化薬のレスバトロール(50 μ M)はTRPM7の発現を顕著に増加させ、eNOSやER α の発現レベルを有意に抑制した。以上の結果から、TRPM7チャネルは内皮機能の重要な調節因子として働いており、その発現上昇や活性化は血管機能障害をもたらす可能性がある。

07-4 TXA₂受容体(TP受容体)アゴニストの昇圧作用に対するドコサヘキサエン酸(DHA)の抑制効果の検討

茅野 大介、外山 貴之、田中 智大、初山 普海、小原 圭将、田中 芳夫
東邦大学 薬学部 薬理学教室

【背景・目的】魚油の継続的な摂取は高血圧時に有意な血圧低下を引き起こす事が報告されている。この降圧作用には、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸による血管拡張が関与すると考えられるが、その機序は十分に解明されていない。我々は、DHA がTXA₂受容体アゴニストによる血管収縮を著明に抑制する事を見出し、この作用がDHAの循環保護効果の一端を担う可能性を示した。一方、高血圧症へのTXA₂の関与は賛否両論であり、DHAのTXA₂受容体を介する収縮抑制作用が降圧効果に繋がるのかも不明である。本研究では、各種高血圧ラットを用いて静脈内投与によるDHAの降圧作用を検討すると共に、高血圧症の血圧調節へのTXA₂の関与について検討した。【方法】1)DHAの降圧作用の検討：ウレタン麻酔下、正常血圧ラット(生理食塩液持続投与ラット、Wistar Kyoto(WKY)ラット)及び高血圧ラット(U46619(TXA₂安定誘導体)持続投与ラット、ノルアドレナリン(NA)持続投与ラット、高血圧自然発症ラット(SHR))に、DHAを大腿静脈より投与し、血圧と心拍数に対する影響を検討した。2)血中TXA₂濃度の測定：SHR及びWKYラットの血漿中TXB₂濃度をEIA法で測定し、血中TXA₂濃度とした。【結果】1)DHAの静脈内投与は、U-46619持続投与ラットの血圧と心拍数を低下させたが、NA持続投与ラット及び生理食塩液持続投与ラットの血圧と心拍数には影響を与えなかった。2)DHAの静脈内投与は、SHRとWKYラットの血圧を用量依存的に低下させたが、その程度はSHRの方が強かった。3)SHRの血中TXA₂濃度は、WKYラットと比べて高値を示した。【考察】DHAは静脈内投与でも降圧作用を示す事が明らかとなり、その降圧作用はTXA₂受容体を介する昇圧成分に対して選択的に働く可能性が示された。また、SHRでは血中TXA₂濃度が高く、DHAの静脈内投与が強い降圧作用を示した事から、高血圧症の血圧調節へのTXA₂の関与が示唆され、これが高血圧時にDHAが強い降圧作用を示す原因となる事が推察された。

07-5 TRICチャンネルによる小胞体Ca²⁺分布

山崎 大樹^{1,2}、陶 晟辰²、竹島 浩^{1,2}

¹京都大学 学際融合教育研究推進センター 生理化学研究ユニット、

²京都大学大学院 薬学研究科 生体分子認識学分野

TRICチャンネルは小胞体膜に局在するカウンターイオンチャンネルであり、TRIC-A及びTRIC-Bの2つのサブタイプから構成される。小胞体からのCa²⁺放出に連動してK⁺を小胞体内腔に導くことでCa²⁺放出を支援する。単離血管平滑筋細胞を用いたCa²⁺スパーク計測の結果からTric-a欠損血管平滑筋ではCa²⁺スパーク頻度が減少し、また平滑筋特異的Tric-a過剰発現血管平滑筋ではCa²⁺スパーク頻度が増加していた。つまりTRIC-Aが血管平滑筋においてリアノジン受容体(RyR)からのCa²⁺放出頻度を制御していることが明らかとなった。一方で、平滑筋には以前より2種類以上の小胞体の存在が示唆されていた。すなわちCa²⁺放出チャンネルであるRyRあるいはイノシトール三リン酸受容体(IP₃R)の片方あるいは両方を有する小胞体である。平滑筋の種類あるいは、動物種によって大きく異なることが知られているため、統一した見解は得られていない。そこで今回、我々はTric-a欠損あるいは平滑筋特異的Tric-a過剰発現マウスから得られた血管平滑筋を用いて、小胞体Ca²⁺分布について検討した。小胞体におけるCa²⁺蓄積量の検討には小胞体Ca²⁺ポンプ阻害薬であるシクロピアゾン酸を用いた。その結果、Tric-a欠損平滑筋においてCa²⁺オーバーロードが生じていた。一方で、Tric-a過剰発現平滑筋では変化がなかった。次にIP₃R刺激のため、 α 1受容体刺激薬であるフェニレフリンを用いた。Tric-a欠損平滑筋ではフェニレフリンにより野生型よりも顕著に大きな反応が得られた。しかしながらTric-a過剰発現平滑筋では、逆に小さい反応であった。最後に、フェニレフリンとカフェインの連続投与によりカフェイン誘導性のCa²⁺応答を比較した。その結果、Tric-a欠損平滑筋では野生型に比べて小さく、反対にTric-a過剰発現平滑筋では大きなカフェイン誘導性Ca²⁺反応が観察された。以上より、Tric-a欠損平滑筋ではIP₃Rが豊富に存在するCa²⁺プールにCa²⁺は局在し、またTric-a過剰発現平滑筋ではRyRを有するCa²⁺プールにCa²⁺が偏ることが示唆された。以上の結果からTRIC-AによるCa²⁺スパーク頻度が小胞体におけるCa²⁺分布を決定付けていることが示唆された。

08-1 胃全摘術後の消化管機能と生活状況との関連性について

中田 浩二、川村 雅彦、古西 英央、岩崎 泰三、村上 慶四郎、志田 敦男、矢野 文章、石橋 由朗、三森 教雄、羽生 信義、小村 伸朗、矢永 勝彦
東京慈恵会医科大学 外科

消化管には排出能や容量負荷耐性(一定量の液体や固形物を受容れる器としての働き)などの機能が存在する。胃全摘術にともなう消化管機能の障害は術後の体重減少や食事量の低下に結びつくと考えられるが、両者の関連性についてはほとんど知られていない。【目的】胃全摘術後の消化管機能(排出能、容量負荷耐性)と生活状況との関連性について検討した。【方法】Stage II以下の胃癌に対して胃全摘術が施行され術後1年以上経過した患者28名に、(1)¹³C呼気試験法胃排出能検査〔200kcal/200mlの液状試験食に¹³C酢酸100mgを混和し摂取後3時間まで呼気を採取、Wagner-Nelson法解析で定量的に排出能(50%排出時間; T1/2)を評価〕、(2)飲水ドリンクテスト(DT);〔体重[kg] ×10 [ml]の水を約5分間で均等な速度で飲水させ、出現した上腹部症状の強さ(0-3点)と持続時間(0-4点)の和(DT合計スコア=容量負荷耐性)を算出〕、(3)アンケート調査(体重変化率、一回食事量、一日食事回数)、を行い、胃全摘術後の消化管機能と生活状況との関連性を単回帰分析により検討した。【成績】胃全摘術後の消化管機能と生活状況との関連性は単回帰分析の結果、T1/2では体重変化率 (b=-0.072, p=0.720)、一回食事量 (b=0.012, p=0.956)、一日食事回数(b=-0.224, p=0.272)、DT合計スコアでは体重変化率 (b=-0.290, p=0.160)、一回食事量 (b=-0.504, p=0.012*)、一日食事回数 (b=0.288, p=0.172)であった。【結論】胃全摘術の生活状況には小腸以下の消化管機能(=容量負荷耐性)が影響を及ぼしているものと考えられた。

08-2 食道癌術後1年未満の再建胃管の運動

遠藤 俊治¹、山田 晃正¹、中川 朋¹、西川 和宏²、西嶋 準¹

¹東大阪市立総合病院 消化器外科、²国立病院機構大阪医療センター 外科

【目的】健常人の消化管では、空腹期に周期的にmigrating motor complex (MMC) phase IIIと呼ばれる伝播性の強い収縮運動が観察される。エリスロマイシン投与でもMMC phase IIIが惹起されることが知られている。食道亜全摘後の再建臓器の胃管にも収縮運動が出現することが報告されているが、術後3年未満ではMMC phase IIIを認めないとされている。今回我々は、食道亜全摘術後1年未満の患者で胃管の空腹期運動を測定し、エリスロマイシン投与後の反応を測定した。【方法】症例は60-74歳の男性3例、のべ4例、食道亜全摘後縦隔経路胃管再建術後3、3.5、5、10か月に検査を行った。10ch(センサー間隔1-3cm)のカテーテル型圧トランスデューサーを経鼻的に十二指腸まで挿入し、センサーを胃幽門前庭部から十二指腸下行脚まで位置させた。空腹時の胃管・十二指腸収縮運動を2~24時間測定し、エリスロマイシン静脈注射(1mg/kg/15分)後の運動を測定した。【成績】すべての症例で空腹期に胃管・十二指腸に収縮波をみとめるものの、同時性や逆蠕動や、十二指腸から起始するもので、胃管から十二指腸に伝播するMMC phase IIIは認めなかった。エリスロマイシン静脈注射では、1例に胃管から十二指腸に伝播するMMC phase IIIを認めた。【結論】術後1年未満の症例では胃管から発生するMMC phase IIIを認めなかったが、エリスロマイシン静注後にMMC phase IIIを認めた症例があった。

08-3 胃内で半固形化する新規濃厚流動食(ハイネイーゲル)経口摂取後の胃排出

楠 裕明¹、山下 直人¹、塚本 真知¹、神崎 智子¹、本多 啓介¹、井上 和彦¹、
眞部 紀明²、畠 二郎²、中藤 流以³、石井 学³、松本 啓志³、垂水 研一³、鎌田 智有³、
塩谷 昭子³、春間 賢³

¹川崎医科大学、総合臨床医学、²川崎医科大学、内視鏡・超音波センター、

³川崎医科大学、消化管内科学

【背景と目的】液体栄養剤を用いた経腸栄養管理の問題点に胃食道逆流や下痢などがあり、その解決法として寒天や増粘剤で液体をゲル化する半固形化栄養法が考案されたが、その調整や経管投与は容易ではない。そのため、投与時は液体であるが胃内の低pH環境下で粘度が増しゲル化する新規栄養剤(ハイネイーゲル：375 ml、300 Kcal、以下イーゲル)が、投与しやすい半固形栄養剤として発売された。しかし、イーゲルの胃排出動態を検討した報告はなく、われわれはイーゲルの胃排出能を超音波法と呼気試験法を用いて評価し、既存の対照食品と比較した。【対象と方法】男性健常人4名(年齢26、28、37、42歳)を対象に、イーゲルと対照食品(ハイネ300mlに水75mlを加えイーゲルと同容量、同カロリーとした)に¹³C-酢酸ナトリウム塩100mgを混和し、坐位にて3分間以内で経口摂取させた。胃排出能は¹³C呼気試験法と超音波法を用いて評価したが、¹³C呼気試験法は第44回日本平滑筋学会ワークショップ「標準法4時間法」を用い、投与前および摂取後240分までの18ポイントで呼気を採取し、Wagner-Nelson法で評価した。超音波法は前庭部横断面積を呼気試験と同じポイントで計測し、その変化から胃排出曲線を作成した。試験は1週間以上の間隔を空けて計2回施行し、各々の栄養剤をクロスオーバーで摂取させた。栄養剤の摂取する順番は登録順に決定した。【結果】呼気試験のTmaxは、対照食品で90分、イーゲルで75分であった。イーゲルでは呼気排出速度曲線の立ち上がりが若干早い傾向もあったが、全体的には両者の胃排出動態に大きな差は見られなかった。超音波法でもイーゲルの方が胃排出が早い傾向が見られたが、両者の胃排出動態に大きな差は見られなかった。【結語】栄養剤のゲル化は早期胃排出を遅延させ、最終的な胃排出時間は短縮させることを期待したが、結果は期待通りとは言えず、胃内での物性変化前に一部は十二指腸に流出した可能性も考えられた。

08-4 High Resolution Manometryによる胃切除後の食道機能評価

遠迫 孝昭、松本 英男、窪田 寿子、村上 陽昭、東田 正陽、中村 雅史、
平井 敏弘

川崎医科大学附属病院 消化器外科

はじめに当科では、早期がん症例に対して、LESと迷走神経肝枝・腹腔枝を温存し、胃全摘あるいは噴門局所切除術を行う機能温存手術を行ってきた。この術式は、LES機能温存により逆流を防ぐことでQOLの改善を図ることを目的としている。High Resolution Manometry (HRM) は、LES機能を含めて食道のmotilityを一度に評価できる優れた機能評価法である。我々は、HRMを用いてLES・神経温存術式のLESを含む食道機能評価を試みた。対象・方法：LES・神経温存を行った胃全摘例7例、LES・神経温存噴門部分切除術6例、HRMを測定した。また、神経温存のできていない胃全摘例4例も同様に測定した。結果：LES・神経温存胃全摘7例のうちLES機能の温存が確認されたのは6例でありこの6例は食道にも正常の蠕動を認めた。integrated relaxation pressure (IRP)、Distal contractile integral (DCI)、Contractile front velocity (CFV)などのパラメーターも正常であった。またLES・神経温存噴門部分切除の6例では、LES圧の温存が4例に確認されたが、1例はWeak contractionで1例はFailed contractionであった。一方、非温存の胃切除例ではLES圧は認めず、2例はweak contractionであった。まとめHRMを用いることで術後の食道機能を評価でき、術後の経口摂取の評価につながる可能性があると考えられた。

08-5 慢性下痢, 便秘における腸内環境の比較検討

瓜田 純久、河越 尚幸、貴島 祥、佐藤 高広、福井 悠人、竹本 育聖、田中 英樹、佐々木 陽典、石井 孝政、前田 正、渡辺 利泰、菅澤 康幸、宮崎 泰斗、原 規子、本田 善子、財 裕明、中西 員茂、島田 長人、中嶋 均

東邦大学 総合診療・救急医学講座

【目的】便秘, 下痢は日常診療で遭遇する症候である。消化管運動は下痢において亢進し, 便秘において低下していると考えられ, 各々prokinetics, 抗コリン薬が用いられることが多い。腸内細菌については, 両者ともに変化していることが推定されるが, ともにprobioticsが治療薬として用いられている。このような背景から, 今回, 慢性下痢, 便秘における消化管運動, 小腸細菌増殖について検討した。【方法】下痢型過敏性腸症候群(IBS)26例, 週3回未満の排便で, 排便に緩下剤を要する便秘症例7例, 便通異常のないボランティア9例を対象とした。朝空腹時に ^{13}C -acetate 100mgとラクトコース15mLを液状食200mL(200kcal)に混入して飲用させ, 10分間隔で180分まで呼吸を採取した。呼吸中 ^{13}C CO₂排出が最大となる時間(Tmax)を胃排出速度の指標とし, 呼吸中水素・メタンガスをのいずれかが2連続測定ポイントで飲用前値より10ppm以上上昇した時点を, 口-盲腸通過時間(OCTT)とした。また, 呼吸中水素・メタンガス上昇がTmaxよりも早期にみられた場合, 複数のピークを有した場合には, 小腸細菌増殖(SIBO)ありとした。【成績】Tmaxは下痢群59±19分, 便秘群57±16分, 対照群51±8分であり, 下痢, 便秘ともにやや遅延傾向を示した。OCTTを測定できた症例を比較すると, 順に76±69分, 133±29分, 81±39分と便秘群がもっとも時間を要した。しかし, OCTTを測定できなかった症例が順に42%, 33%, 43%を占めた。SIBOは順に46%, 56%, 57%であり, 各群で差はなかった。SIBOおよびOCTT測定不能例を腸内環境の異常と考えると, 順に18/26例(69%), 5/7例(71%), 6/9例(67%)と各群で差はなかった。【結論】呼吸試験を用いた検討では, 胃排出速度は下痢と便秘で差はなく, OCTTは便秘で遅延傾向がみられた。腸内細菌量(発酵)の目安となる呼吸中水素およびメタン排出総量は, 対照群で最も高値であり, 下痢群が最も低値であった。SIBOおよびOCTT測定不能例を腸内環境の異常と考えると, 各群で差はなく, 腸内細菌の発酵量と下痢, 便秘との関連は明らかではなく, むしろ消化管運動の変化が明瞭であった。

09-1 Th17関連サイトカインであるInterleukin-23は、食道平滑筋収縮性低下に関連する

伊原 栄吉、深浦 啓太、牟田 和正、田中 義将、白 暁鵬、中村 和彦、高柳 涼一

九州大学大学院 医学研究院 病態制御内科学

【背景】局所で惹起された炎症は消化管平滑筋の収縮性に影響を及ぼし病態に密接に関わる。炎症を引き起こす消化管免疫応答の司令塔、ヘルパーT (Th) 細胞はそのサイトカインの分泌パターンによってTh1細胞、Th2細胞及びTh17細胞に分類される。動物を用いた基礎研究において、これらTh1、Th2及びTh17関連サイトカインと消化管平滑筋の収縮性変化との関連性が示唆されているが、実臨床での検討は不十分である。【目的】本研究の目的は、実臨床において食道粘膜に発現している各種サイトカインの発現量と食道運動異常との関係を解明することである。【方法】食道運動異常症を疑う患者さん12名に対して、高解像度食道内圧検査 (HRM) を施行した。食道運動機能の評価は、DCI(食道体部)、Basal LES圧(下部食道括約筋)にて行った。また、食道体部及び下部食道括約筋部の食道粘膜よりそれぞれ生検組織を採取し、TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-13、IL-17A、IL-23A、IL-6をreal time RT-PCR法にて測定した。基礎的検討として、今回食道収縮性変化と最も関連があったIL-23が及ぼす消化管平滑筋収縮性変化を、ラット回腸平滑筋標本作成し組織培養法を用いて検討した。【結果】HRMによる診断結果は、シカゴ分類にて、正常5名、食道アカラシア2名、食道胃接合部通過障害2名、遠位食道痙攣1名、無蠕動1名、微弱蠕動1名で、DCI 3364.3 ± 936.8 mmHg-cm-sec、Basal LES 28.3 ± 3.1 mmHgであった。食道運動機能と各種サイトカイン発現量との相関では、IL-23とDCIとに強い負の相関 ($R = -0.79$, Adjusted $R^2 = 0.56$, $p=0.012$) を認めた。また、IL-23とBasal LESとには負の相関となる傾向 ($R = -0.52$, Adjusted $R^2 = 0.21$, $p=0.078$) を認めた。基礎的検討では、IL-23処理は、カルバコールによる収縮反応には影響を与えなかったが、K+脱分極刺激に対する収縮反応を低下する傾向を認めた。【まとめ】食道運動機能において、Th17関連サイトカインであるIL-23は食道の収縮性低下に関連している可能性が示唆された。

09-2 新規5-HT2B receptor antagonist, RQ-00310941のラットにおける内臓知覚過敏と便通異常に対する効果の検討

財 裕明¹、高橋 伸行²、須藤 雅樹²

¹東邦大学医学部総合診療・救急医学講座 総合診療科、²ラクオリア創薬株式会社

【背景】過敏性腸症候群(IBS)の病態には5-HT receptorを介した興奮伝達経路が深く関わる。5-HT2B receptorはヒト結腸平滑筋および筋層間神経叢に存在し、5-HTによって引き起こされる縦走筋の収縮に関与すると考えられている。【目的】新規5-HT2B receptor antagonist,RQ-00310941の効果をラット2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)誘発腸炎後の内臓知覚過敏モデルおよび拘束ストレスモデルを用いて検討するとともに、正常ラットの排便に与える影響を検討。【方法】雄性SDラット(9-10週齢)を使用。1)TNBS誘発腸炎・内臓知覚過敏モデル：近位結腸にTNBSを投与し腸炎・内臓知覚過敏モデルを作成。TNBS処理1週後にcolorectal distension (CRD)をバロスタットで行う。RQ-00310941 (0.1, 0.3, 1 mg/kg)をCRD開始30分前に経口投与し痛みの閾値をabdominal crampにより判定。2)TNBS誘発内臓知覚過敏+拘束ストレスモデル：TNBS処理により内臓知覚過敏を誘発されたラットを50x190x55 mmのケージ内に2時間拘束。RQ-00310941 (1, 3, 10 mg/kg)は拘束開始30分前に経口投与し、拘束中2時間のfecal pellet重量を測定。重量はwet weightとdry weightを測定。3)正常ラットにRQ-00310941 (3, 10, 30 mg/kg)を投与しfecal pelletのwet weightとdry weightを測定。【結果】1)TNBS誘発内臓知覚過敏モデル：RQ-00310941は、用量依存性に痛みの閾値を上昇させ、1 mg/kgの用量でvehicleとの比較で有意差を認めた。2)TNBS誘発内臓知覚過敏+拘束ストレスモデル：ストレス負荷によりfecal weightが増加した。RQ-00310941は用量依存的にfecal weightを減少させ10 mg/kgの用量で有意差を認めた。3)正常ラットのfecal weightはいずれの用量でも有意に変化しなかった。【結論】RQ-00310941はラットTNBS誘発腸炎モデルおよび拘束ストレスモデルにおいて、用量依存的に内臓知覚過敏と便通異常を改善した。その一方で、正常ラットにおける便通に影響を与えなかった。これは5-HT3 receptor antagonistの薬理作用と非常に異なる点であり、5-HT2B receptor antagonistはIBSの薬物治療においてより広い適応を有している可能性がある。

09-3 大建中湯の抗線維化狭窄作用に関わる消化管筋線維芽細胞TRPA1の分子機序

倉原 (海)琳¹、西村 美保¹、青柳 邦彦²、平石 敬三¹、井上 隆司¹

¹福岡大学 医学部 生理学、²福岡大学 医学部 消化器内科学

<背景>大建中湯は人参・乾姜・山椒から構成され、消化管運動促進作用、腸管血流増加作用及び消化管ホルモン分泌作用が確認されている。術後イレウスや手術後の腸管癒着の軽減、広く外科領域で用いられてきた。我々は、腸管線維化狭窄で大きな役割を果す筋線維芽細胞を用いて、多様な刺激に反応するTRPチャンネルと線維化狭窄の関係について検討を行ってきた。ヒト消化管筋線維芽細胞株InMyoFibを用いたマイクロアレイ実験では、TRPファミリーの中でTRPA1の発現が最も多いことが分かった。<目的>大建中湯の抗線維化狭窄作用に消化管筋線維芽細胞TRPA1がどのように関わるのかを検討する。<方法>Ca²⁺イメージング法を用いて、大建中湯およびその成分がInMyoFib細胞TRPA1チャンネルの機能への関与を検討；リアルタイムPCR法や免疫プロット法でTRPA1チャンネルの発現やTGF線維化刺激下流の情報伝達経路への影響を調べた。<結果>大建中湯およびその有効成分(ginsenoside Rb1, [6]-shogaol, hydroxyl- α -sanshool)についてInMyoFibに及ぼす効果を検討した結果、【1】[6]-shogaol、大建中湯エキス、乾姜エキス、山椒エキスがInMyoFibへのTRPA1を介するCa²⁺流入を惹起した。【2】大建中湯エキスがTRPA1のmRNA・タンパク発現を有意に促進した。【3】InMyoFib細胞をTGF β 1 (5ng/ml)で刺激することによって、線維状の形態変化が観察されるが、同時にTRPA1選択的阻害剤HC030031を添加することによって線維状の形態変化が顕著に加速された。【4】TRPA1 siRNA 遺伝子干渉実験から、TRPA1は線維化刺激因子TGF β 1下流のSmad-2、p38MAPKのリン酸化を抑制した。【5】大建中湯エキスはTGF β 1下流のリン酸化を抑制して、タイプ1コラーゲンの発現を抑制した。【6】大建中湯エキスは単独でタイプ3コラーゲンのmRNA発現を抑制した。<考察>以上のことから、大建中湯に含まれる乾姜や山椒の成分は、消化管筋線維芽細胞のTRPA1開口作用を持つ；また大建中湯はTRPA1チャンネルの発現を増やすことによってTGF β 1刺激下流の線維化シグナルを抑制している。これらは大建中湯の抗線維化作用の作用機序の一つである可能性が示唆された。

09-4 ICCミュータント動物における塩化ベンザルコニウム損傷腸管神経再生過程では異所性神経細胞が出現する

玉田 宏美、木山 博資

名古屋大学大学院 医学系研究科 機能組織学

【背景】カハールの介在細胞 (Interstitial cells of Cajal : ICC) は、平滑筋、神経と協調し、消化管の正常機能を支える要素の一つである。また、Hirschsprung病で見られる腸管神経節の欠損部位でのICCの欠損など、消化管発生過程においても、ICCと他の細胞のインタラクションについて注目されている。しかしながら、成体における腸管神経損傷後の修復、再生において、ICCがもたらす影響については、ほとんど報告されていない。そこで本研究では、ICCミュータント動物での神経損傷後の修復過程に注目し、腸管神経再生とICCとの関連について検討した。【方法】野生型マウス (C57BL/6NcrSlc) と、ICCミュータントマウスである W/W^e マウス (WBB6F1/Kit- Kit^{W^e} /Slc) を用いた。 W/W^e マウスにおいて、筋層間神経叢のICC (ICC-MP) が欠損している部位である回腸を材料とし、その一部 (回盲部より1.5-2cm空腸側、0.5cmの範囲) に消化管壁外から塩化ベンザルコニウムで30分間処理し、腸管神経損傷モデルとした。NOSを含む神経細胞を標識するNADPH染色、また、PGP9.5などの神経マーカーで免疫組織化学染色を行い、形態学的に解析を行った。【結果】本条件下で、処理直後は、野生型、 W/W^e マウスいずれにおいても、NADPH染色で標識される神経細胞、神経線維は損傷部位で見られなかった。処理2週間後、損傷部位において神経細胞を含む筋層間神経叢の再生は見られないが、縦走筋層内に走行する神経線維の再生が野生型、 W/W^e マウス共に見られた。また、縦走筋層内あるいは漿膜下にNADPH陽性の細胞の存在が、野生型では観察されないが、 W/W^e マウスにおいて顕著に確認された。この細胞はPGP9.5陽性であることから、神経細胞であることが支持された。【考察】本研究で、腸管神経修復過程において、ICC-MPの欠損に伴い、筋層間神経叢より漿膜側に異所性の神経細胞が分布する傾向が高くなることが明らかになった。このことから、再生された腸管神経の正常局在の調節に、ICC-MPが関与する可能性が考えられた。

010-1 RAG-2欠損卵白アルブミン感受性T細胞レセプタートランスジェニックマウスにおけるTh2優位空腸炎の消化管運動異常

森 大祐¹、足立 (中嶋) はるよ^{2,3}、藤村 陽子²、芝原 恭子^{2,3}、八村 敏志^{2,3}、村田 幸久⁴、尾崎 博¹、堀 正敏¹

¹東京大学 大学院 農学生命科学研究科 獣医薬理学研究室、

²東京大学 大学院 農学生命科学研究科 応用生命化学専攻、

³東京大学 大学院 農学生命科学研究科 食の安全研究センター 免疫制御研究室、

⁴東京大学 大学院 農学生命科学研究科 応用動物科学専攻 放射線動物科学研究室

【背景と目的】寄生虫感染症や卵白アルブミン (OVA) によって誘発されるTh2細胞が優位なアレルギー性腸炎では消化管運動は亢進される。この分子機構としてIL-4が直接平滑筋収縮能を活性化することが報告されているが、これを否定する報告もあり統一した見解は得られていない。本研究では、IgEを介した即時型アレルギー応答をおこさずにTh2優位腸炎モデルを作製し、消化管運動機能に対する影響を明らかにすることを目的とした。【方法】実験にはOVAペプチドを特異的に認識するT細胞レセプターをRAG-2欠損マウスに強制発現させたマウス (Rag-/-OVA23-3マウス) を用いた。このマウスはB細胞を持たないことから、OVAの投与によりOVA特異的IgE産生による即時型アレルギー応答を生じずにTh2優位の腸炎を惹起させる。【結果】OVAの経口投与により、投与7日にかけて軟便と体重減少が認められた。病理学的解析により投与7日目には空腸絨毛の萎縮と炎症細胞の粘膜下織への浸潤が認められた。IL-4とIL-13のmRNA発現はOVA投与3日から7日にかけて顕著に増加した。これに対してIL-1 β 、TNF- α のmRNA発現はOVA投与3日目のみで有意に増加し、IL-17のmRNA発現は7日目でのみ有意に増加した。OVA投与7日目の摘出空腸消化管層筋標本において、CChによる収縮反応は有意に低下した。この標本ではCPI-17のタンパク質発現量が有意に減少していた。また、OVA投与7日におけるin vivoでの消化管輸送能も有意に低下していた。ラットの回腸組織培養において、IL-4ならびにIL-13 (10 ng/ml、3日間処置) はCChによる収縮に影響を与えなかった。【考察】Rag-/-OVA23-3マウスを用いたTh2細胞優位の腸炎モデルにおいて消化管運動は抑制されることが明らかになった。また、Th2サイトカインは消化管平滑筋収縮機構には直接影響しないことが示された。これらのことから、アレルギー性腸炎における消化管運動亢進にはIgEを介した即時型アレルギー応答が寄与する可能性が考えられた。

010-2 ブタ胃底部平滑筋のカルバコール収縮に対する各種選択的ホスホジエステラーゼ阻害剤の影響

金田 剛治¹、中村 有早^{1,2}、佐々木 典康²、浦川 紀元¹、清水 一政¹

¹日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医薬理学研究室、

²日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医保健看護学科、

³日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 獣医生化学研究室

機能性胃腸症は器質的変化を伴わない疾病で、日本人の4人に1人が症状を訴えているが、その原因は未だ明らかになっていない。一方、胃平滑筋においても他の平滑筋と同様に環状スクレオチドが運動機能の制御に関与するが、その環状スクレオチドの制御を担うホスホジエステラーゼ(PDE)のアイソフォームについての役割は未だに明らかになっていない。【目的】本研究は、ブタ胃底部平滑筋の縦走筋および輪走筋のカルバコール(CCh)収縮に対する各種選択的PDE阻害剤の抑制効果と環状スクレオチドの関連性について調べた。【方法】ブタ胃は屠畜場より入手した。栄養液は修正Tyrode液を使用し、張力実験は張力トランスジューサーを用いて等尺性に測定し、記録計に記録した。RT-PCRは常法に従って行った。またcGMP含量の測定はELISA法にて行った。【成績】ブタ胃底部縦走筋および輪走筋のCCh(1 μ M)収縮に対し各種選択的PDE阻害剤は、いずれも濃度依存性に抑制し、その抑制効果は縦走筋においてvardenafil(5型)>BAY736691(9型)>Ro20-1724>EHNA(2型)>vinpocetine(1型)>BRL-58481(7型)>milrinone(3型)の順に大きく、輪走筋においてはvardenafil(5型)>BAY736691(9型)>vinpocetine(1型)>EHNA(2型)>Ro20-1724(4型)>milrinone(3型)>BRL-58481(7型)の順に大きかった。胃底部縦走筋および輪走筋において、RT-PCR分析よりPDE5型のmRNA発現が確認された。胃底部縦走筋および輪走筋において、CCh存在下でvardenafilは濃度依存性にcGMP含量を増加した。【結論】以上より、ブタ胃底部平滑筋においてPDE5型阻害剤のvardenafilはcGMP含量の増加を伴いCCh収縮を抑制した。また、ブタ胃底部縦走筋および輪走筋においてPDE5型のmRNA発現が見られたことから、ブタ胃平滑筋の収縮機能の制御にPDE5型が関連することが示唆された。

010-3 腸炎症モデル動物を用いた平滑筋組織の収縮反応におけるカルシウム動員機構の解析

野部 裕美¹、石田 行知¹、野部 浩司²、坂井 泰¹

¹文京学院大学 保健医療技術学部 理学療法学科、²城西大学 薬学部 薬学科

【目的】消化管平滑筋の収縮にはCa²⁺が関与する。我々は、クローン病態モデル動物として消化管に炎症を惹起させたラット結腸平滑筋においてcarbachol(CCh)による収縮機能が低下することを報告してきた。今回はこの収縮能低下について、細胞内外のCa²⁺動態の関与について検討した。【方法】雄性ウイスター系ラット(7週齢)を用い、TNBS(炎症群)と生理食塩水(非炎症群)を結腸内腔に腸注した。3日後処置した両群から結腸を摘出し、粘膜を除いた平滑筋層のみのリング標本とし、張力変化を等尺性に記録した。【結果・考察】炎症処置3日後のラットの体重は、非炎症群に対して約90%と有意に減少した。これは、結腸に炎症が惹起され腸管の運動性に障害が引き起こされ、栄養分摂取や水分吸収の低下などにより体重が減少したと考えられる。そこで、CChによる収縮反応を測定したところ非炎症群、炎症群ともに収縮反応性は用量依存性であったが、炎症群は非炎症群と比較して1 μ M以上の濃度のCChによる収縮反応が部分的にはあるが、有意に抑制された。細胞外のCa²⁺を除去した条件やニフェジピン(1 μ M)を5分間前処置した際の10 μ M CChによる反応は、両群ともほぼ消失した。さらに、SRからのCa²⁺の放出に関しては、カフェイン(10 μ M)とライアノジン(20 mM)が同時に存在する条件で、両群のCCh反応はほぼ完全に抑制された。しかしながら、一般にはIP3代謝阻害剤として知られるU73122(3 μ M)存在下では、CCh反応は炎症、非炎症両群で抑制されなかった。U73122にはSERCAを抑制するとの報告もある(Hollywood et al., 2010)ので単純ではないが、これらの結果は、炎症・非炎症に関わりなく、CChの収縮作用にはSRのIP3感受性チャネルの寄与は少ないことが示唆される。【結論】結腸平滑筋の収縮反応には、細胞外からのL型Ca²⁺チャネルを介したCa²⁺の流入とSRのライアノジン感受性チャネルによるCa²⁺の放出機構が収縮に大きく関与するが、TNBSを用いた炎症による障害はそれらの収縮要因への影響は小さいことが明らかとなった。

O10-4 マウス小腸平滑筋細胞に発現するK⁺チャンネルに対するSKF96365の抑制効果

棚橋 靖行¹、王 班¹、村上 友梨¹、海野 年弘²、松山 勇人²、小森 成一²

¹京都産業大学 総合生命科学部 動物生命医科学科 薬理学研究室、

²岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科 獣医薬理学研究室

【目的】SKF96365(SKF)は、TRPCチャンネルの阻害薬としてよく用いられているが、電位依存性Ca²⁺チャンネルなどの他のイオンチャンネルの活性を抑制することも報告されている。そこで、本研究では、腸管平滑筋細胞に発現する各種K⁺チャンネルに対するSKFの効果について検討した。【方法】実験には、マウス小腸縦走筋から酵素処理により単離した平滑筋細胞標本を用い、SKFを適用した時のATP感受性K⁺チャンネル(K_{ATP})電流、電位依存性K⁺チャンネル(K_V)電流、Ca²⁺活性化K⁺チャンネル(K_{Ca})電流の変化を、ホールセルパッチクランプ法により、それぞれ記録した。【結果】単一平滑筋細胞標本において、K_{ATP}開口薬であるクロマカリム(10 μM)によりK_{ATP}電流を発生させながら、SKF(0.03-10 μM)を累積適用すると、濃度依存的に電流が抑制された。そのIC₅₀値はおおよそ1 μMであった。また、-80 mVの保持電位から+20 mVまでの脱分極パルス(持続時間:2 sec)を0.05 Hzの頻度で繰り返し与えることによりK_V電流を誘発させながら、SKF(1 μM)を適用したところ、同電流の振幅は減少した。しかし、その抑制の程度はわずか16 %程であった。一方、0 mVの保持電位において発生する外向きの自発性K_{Ca}電流の振幅は、SKF(1 μM)を適用しても、殆ど影響を受けなかった。【考察・結論】以上の結果は、SKFは腸管平滑筋細胞に発現するK⁺チャンネルの中でもK_{ATP}チャンネルに対して親和性が高く、その活性を抑制することが明らかとなった。腸管平滑筋細胞において、TRPCから構成されている陽イオンチャンネルに対するSKFのIC₅₀値は約10 μMと報告されている。したがって、SKFをTRPC阻害薬として使用する際は、この点を十分考慮して使用する必要があると考えられる。

ランチョンセミナー

LS1 知って得する慢性便秘症治療－機能性消化管障害の観点から－

二神 生爾

日本医科大学 消化器内科学

慢性便秘症患者の多くは、女性や高齢者であることが知られている。その愁訴は、排便困難、排便回数減少、残便感などによる複合的なものである。

慢性便秘症は、Rome IIIによる機能性便秘に加えて、IBS-C、機能性直腸肛門障害を含めた、広いカテゴリーで捉えられている。この慢性便秘症患者は、physicalにも、mentalにもQOLが低下することが、知られている。私たちは、多くの便秘症の方のうち、どのような患者に注意を払い、積極的に検査を実施すべきなのか知っていなければならない。慢性便秘症の中には、FD症状やGERD症状を随伴症状として認める、overlap症候群も多く含まれていると考えられている。今回、このようなアプローチからも慢性便秘症を捉えるとともに、一昨年来、新規の慢性便秘症治療薬として脚光を浴びている、ルビプロストン(アミティーザ®)の自験例などを含め、少しでも”聞いて得する”情報をお届けしたい。

LS2 胃食道逆流症(GERD)-病態・症状、診断、労働生産性から

鈴木 秀和

慶應義塾大学医学部内科学(消化器)

近年の食生活の欧米化や急速な高齢化、さらにはピロリ菌感染率の減少などにより、我が国でも逆流性食道炎を含む胃食道逆流症Gastro-esophageal reflux disease(GERD)の罹患率は増加している。GERDは胃内容物の食道逆流により胸やけなどの症状や食道内外の合併症を生じる病態であり、食道蠕動の低下、食道裂孔ヘルニアや下部食道括約筋弛緩、酸分泌増加による、酸を含む胃内容物の逆流増加、食道の知覚過敏などにより、胸やけや呑酸症状をきたす疾患である。胸やけ症状の強さは必ずしも内視鏡でみた粘膜傷害(mucosal break)所見の重症度とは必ずしも相関しない。実際に症状発現様式は、様々で、胸焼けや呑酸、嘔気、さらには、非心臓性胸痛(NCCP: non cardiac chest pain)、慢性咳嗽、喘息様発作などの食道外症状もきたす。内視鏡にて明らかな粘膜所見を認める逆流性食道炎、胃食道逆流はあるも粘膜所見のない非びらん性胃食道逆流症(NERD)に大別されるが、逆流がないにもかかわらずGERD症状を認める機能性胸焼け(functional heartburn)や、食後の胃もたれや心窩部痛を主症状とする機能性ディスペプシアとの鑑別も治療の反応性を規定する点から非常に重要である。実際にGERDでは、症状発現による生活の質(QOL)の低下、さらには労働生産性の低下が顕著であることがわかってきており、不十分な治療もその一因として注目される。今回は、GERDの病態論的、症候学的、診断学的、治療学的側面と問題点についてまとめたい。

LS3 第二の平滑筋:筋線維芽細胞のダイナミズム

尾崎 博

東京大学大学院農学生命科学研究科 獣医薬理学教室

第二の平滑筋として、筋線維芽細胞myofibroblastが今注目され始めている。線維芽細胞の中で、 α 平滑筋アクチン(α SMA)を比較的多く発現する細胞がそう呼ばれる。広く認められているわけではないが、あえて分けるなら以下の4つに分類できると思う。

1) 特殊に分化した筋線維芽細胞群

毛細血管周囲を取り囲む周囲細胞pericyteがこれにあたる。周囲細胞は全身の血管に広く分布するが、臓器ごとにさらに特殊に分化した形態をとることもある。例えば、肝臓の類洞を囲む肝星細胞、腸上皮直下の毛細血管網に接着構造をとる腸筋線維芽細胞、腎糸球体を囲むメサングウム細胞、さらに降星細胞などがこれに当たる。これらの細胞が慢性炎症で活性化されると臓器線維症へと繋がると考えられている。

2) 線維芽細胞の活性化

臓器実質には多数の線維芽細胞が分布しているが、これらの細胞の一部には α SMAを発現するものもある。例えば、肝門脈周囲の間質にはこの様な α SMA陽性の細胞が散見され肝筋線維芽細胞と呼ばれている。慢性炎症に伴って活性化し活性化星細胞とともに肝硬変の原因となる。

3) ガン筋線維芽細胞

腫瘍組織には癌細胞に加えて様々な免疫系細胞、血管やリンパ管を構成する脈管系細胞が存在するが、さらに α SMAを発現する筋線維芽細胞が多数存在し、がん微小環境(ニッチ)を構築する。

4) 上皮間葉変換

上皮系細胞は、障害時に α SMAを発現する間葉系細胞へと変換することが知られ、上皮間葉転換(epithelial to mesenchymal transition: EMT)と呼ばれる。血管内皮細胞も間葉転換する(endothelial to mesenchymal transition: EndoMT)。

筋線維芽細胞の主な機能として、線維素産生による障害部位修復が挙げられるが、微小環境における運動機能、収縮による障害部位の縮小、そして多彩な炎症メディエーターの産生機能もまた重要である。これまで筋線維芽細胞研究は、主として病態研究の立場から臓器単位で個別に行われてきたが、筋線維芽細胞の生物学という観点から系統的に行われることはほとんど無かった。演者は10年ほど前から筋線維芽細胞の収縮機能に興味を持ち始め、研究を進めてきた。本講演では、収縮と遊走機能に着目した我々の研究を中心に筋線維芽細胞研究を紹介したい。

LS4 機能性ディスぺプシアの現状とアコチアミドー診療ガイドライン2014と病態へのアプローチ

楠 裕明

川崎医科大学 総合臨床医学

機能性ディスぺプシア(FD)とは、上部消化管内視鏡検査などによって器質的疾患が指摘されない上腹部不定愁訴患者のうち、ローマIII診断基準を満たす患者の総称であるが、2014年4月に新たな診療ガイドラインが発表された。このガイドラインの特徴はいくつかあるが、大きく注目される点は2つある。ひとつは内視鏡検査で胃炎の所見があった場合に、*H. pylori*(Hp)の診断を行い、陽性の場合にはHp関連性FDとして除菌を行うことが推奨(推奨レベル1)されたことであり、もう一つはFDと診断された患者の初期治療に、4週間を目処とした酸分泌抑制薬や運動機能改善薬の使用が推奨(推奨レベル1)されたことである。漢方薬や抗うつ薬、抗不安薬は二次治療薬としての使用が推奨(推奨レベル2)されることとなった。アコチアミドは現在FDを対象とした唯一の治療薬であり、本年6月に長期投与も可能となるため、初期治療の中心的薬剤として使用されると思われる。われわれはこの薬に胃排出障害や胃適応性弛緩障害の改善作用があることを、超音波(US)を用いて臨床的に報告したが、精神疾患を合併したFD患者の運動機能も改善させることを証明した。今回のガイドラインでは消化管運動機能検査の有用性も検討されたが、本邦の一般診療では運動機能検査が十分に浸透していないため、日常診療での有用性は明らかでないと考えられた。しかし、FDには胃排出障害や胃適応性弛緩障害を病態に持つFD例があることはステートメントにも挙げられており、治療抵抗性のFD患者には何らかの運動機能検査が検討されるべきであることから、今後は呼吸試験やUS法などの運動機能検査の一般化に向けた努力も必要であると思われる。