

氏 名 (本籍)	長 崎 正 明 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博乙第2号
学 位 授 与 年 月 日	平成7年3月14日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	消化管平滑筋における trimebutine の作用機構 に関する研究
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 大 橋 秀 法 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義 副査 帯広畜産大学 教 授 西 村 昌 数 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 笹 本 修 司

論 文 の 内 容 の 要 旨

長崎正明君の博士 (獣医学) の学位請求論文は、消化管運動機能調整薬として使用されている trimebutine が運動機能の低下時には促進作用を発揮し、反対に促進時には抑制作用を発揮するという二面的な作用の基礎となっている機構を解明することを目的として、消化管平滑筋における細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力関係、膜のイオンチャンネル活動、細胞内 Ca 貯蔵部における Ca^{2+} 取り込み及び放出などの細胞内 Ca^{2+} 動態、そして収縮系の Ca^{2+} 感受性に及ぼす同薬の影響について検討して得た成績に基づいて作成されている。その内容は以下のように要約できる。

1. 細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力関係に対する作用：モルモット盲腸紐標本を実験対象として、細胞内 Ca^{2+} 濃度を fura-2 法により測定している。Trimebutine は、80 mM K^+ で膜を脱分極することによって発生する一過性とそれに続く持続性の二つの成分からなる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と収縮反応を抑制した。しかし、一過性の成分における細胞内 Ca^{2+} 濃度と収縮反応の大きさの関係には影響を及ぼさなかった。80 mM K^+ を含む Ca^{2+} 除去液中で carbachol により発生する細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と収縮反応を trimebutine は抑制した。

2. 膜のイオンチャンネル活動に対する作用：ウサギ回腸単離平滑筋細胞を実験対象として、膜電流を whole-cell patch clamp 法により測定している。Trimebutine は電位依存性 Ca^{2+} 電流を抑制した。抑制効果は浅い膜電位から誘発した Ca^{2+} 電流に対してより強く発現した。この電流抑制作用には使用頻度依存性はなかった。さらに、trimebutine は Ca^{2+} 電流の膜電位依存性不活性化曲線を過分極側へ平行移動させた。Trimebutine は Ca^{2+} 非依存性及び Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流を抑制した。この抑制作用に関

しては膜電位依存性も使用頻度依存性もなかった。Trimebutineは膜抵抗の増大を伴う脱分極を生じた。

3. 膜標本への [^3H] nitrendipineの結合に対する作用：モルモット回腸の膜標本を実験対象としている。 [^3H] nitrendipineの膜標本への結合は飽和性であり、 K_d 値と最大結合量 (B_{\max}) 値はそれぞれ0.16 nMと1070 fmol/proteinであった。

Trimebutineはこの結合を抑制し、 K_i 値は9.3 μM であった。Scatchard解析によりこの結合抑制作用は競合拮抗様抑制作用であることが分かった。一方、解離実験から trimebutineによる結合親和性の低下は解離速度定数の増大に起因することが分かった。これらの結果は、trimebutineは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの1,4-dihydropyridine結合部と負のアロステリック相互作用を有しており、それにより同チャンネル活動を抑制することを示唆している。

4. Ca^{2+} 動態と収縮系の Ca^{2+} 感受性に対する作用： β -escin処理により作製したモルモット回腸のスキンド化平滑筋標本を実験対象にしている。Trimebutineはcarbacholが生じる細胞内 Ca 貯蔵部から放出される Ca^{2+} に起因する収縮を抑制したが、caffeineとinositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) が生じる同様な収縮を抑制しなかった。Trimebutineは収縮系の Ca^{2+} 感受性を変える作用もcarbacholや $\text{GTP}\gamma\text{S}$ による収縮系の Ca^{2+} 感受性増大効果を変える作用も示さなかった。

以上の結果を総合して次のように結論している。すなわち、trimebutineは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルのdihydropyridine結合部に対する負のアロステリック相互作用により同チャンネルを介する Ca^{2+} 流入量を減少させるとともに、ムスカリン受容体と GTP 結合タンパク質の共役からホスホリパーゼCの活性化を経て IP_3 の産生に至る何れかの過程に作用して細胞内 Ca 貯蔵部からの Ca^{2+} 放出も抑制する。これらにより消化管平滑筋の収縮活性は低下する。一方、trimebutineは K^+ チャンネル活動を抑制して膜の脱分極とそれに伴う活動電位の放電頻度の増加を生じさせる。これにより平滑筋の収縮活性は上昇する。

さらに、trimebutineのこれらの作用が消化管運動機能に対する促進と抑制の二面的な効果の発現にどのように寄与し得るかについて考察している。

審 査 結 果 の 要 旨

長崎正明君の博士（獣医学）の学位請求論文は、消化管運動機能調整薬として使用されているtrimebutineが運動機能の低下時には促進作用を発揮し、反対に促進時には抑制作用を発揮するという二面的な作用の基礎となっている機構を解明することを目的として行った研究成果（基礎となっている2編の学術論文）に基づいて作成されている。その内容は、消化管平滑筋細胞においてパッチクランプ法により測定した膜電流に対するtrimebutineの効果から膜のイオンチャンネル活動に対する作用について解析した成績を述べ、次いで、膜を完全に脱分極させた平滑筋あるいは化学的処理により膜に小孔を開けたいわゆるスキンド平滑筋における張力測定と蛍光色素による細胞内 Ca^{2+} 測定などにより Ca^{2+} 動態と収縮系の Ca^{2+} 感受性に及ぼす同薬の影響について検討した成績を述べている。

1. 膜のイオンチャンネル活動に対する作用：Trimebutineは電位依存性 Ca^{2+} 電流を濃度依存性に抑制した。抑制効果は浅い膜電位から誘発した Ca^{2+} 電流に対してより強く発現した。この電流抑制作用には使用頻度依存性はなかった。さらに、trimebutineは

Ca^{2+} 電流の膜電位依存性不活性化曲線を過分極側へ平行移動させた。Trimebutineは Ca^{2+} チャンネルのdihydropyridine結合部への $[^3\text{H}]$ nitrendipineの結合を負のアロステリック相互作用により濃度依存性に抑制した。Trimebutineは Ca^{2+} 非依存性及び Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流を濃度依存性に抑制し、また膜抵抗の増大を伴う脱分極も生じた。

2. Ca^{2+} 動態に対する作用：Trimebutineは膜を脱分極させた平滑筋において Ca^{2+} が生じる収縮の濃度反応曲線を高濃度側へ用量依存性に平行移動させた。膜を脱分極させた平滑筋及びスキンド平滑筋においてcarbacholが生じる細胞内 Ca 貯蔵部から放出される Ca^{2+} に起因する収縮を抑制したが、スキンド平滑筋においてcaffeineと IP_3 が生じる収縮を抑制しなかった。

3. 収縮系の Ca^{2+} 感受性に対する作用：Trimebutineは収縮系の Ca^{2+} 感受性を変える作用もcarbacholや $\text{GTP}\gamma\text{S}$ による収縮系の Ca^{2+} 感受性増大効果を変える作用も示さなかった。

以上の結果を総合して次のように結論している。すなわち、trimebutineは電位依存性 Ca^{2+} チャンネルのdihydropyridine結合部に対する負のアロステリック相互作用により同チャンネルを介する Ca^{2+} 流入量を減少させるとともに、ムスカリン受容体と GTP 結合タンパク質の共役からホスホリパーゼCの活性化を経て IP_3 の産生に至る何れかの過程に作用して細胞内 Ca 貯蔵部からの Ca^{2+} 放出も抑制する。これらにより消化管平滑筋の収縮活性は低下する。一方、trimebutineは K^+ チャンネル活動を抑制して膜の脱分極とそれに伴う活動電位の放電頻度の増加を生じさせる。これにより平滑筋の収縮活性は上昇する。さらに、このような Ca^{2+} チャンネルと K^+ チャンネルに対するtrimebutineの抑制作用は同じ濃度範囲で発揮されるが、前者の作用が膜電位が浅い時、すなわち収縮活性が高い時により強く発揮される事実に基づいて、消化管運動機能に対する促進と抑制の二面的の効果がどのようにして発現するかについて説明している。

審査委員会は、本論文について審査し、学位論文として十分な価値があると判定した。