

論文目録

氏名 長崎 正明



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

学位論文の基礎となる学術論文

題目 Effect of trimebutine on voltage-activated calcium current  
in rabbit ileal smooth muscle cells

著者名 Nagasaki, M., Komori, S. and Ohashi, H.

学術雑誌名 British Journal of Pharmacology に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( 110 ・ 1 ・ 399 ~ 403 )

発行年月 1993 年 9 月

題目 Effect of trimebutine on K<sup>+</sup> current in rabbit ileal smooth  
muscle cells

著者名 Nagasaki, M., Komori, S., Tamaki, H. and Ohashi, H.

学術雑誌名 European Journal of Pharmacology に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( 235 ・ 2-3 ・ 197 ~ 203 )

発行年月 1993 年 4 月

題目

著者名

学術雑誌名 に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( . . ~ )

発行年月 年 月



既発表論文

題 目 Effects of trimebutine on cytosolic  $Ca^{2+}$  and force transitions  
-----  
in intestinal smooth muscle

著 者 名 Nagasaki, M., Kobayashi, T. and Tamaki, H.

学術雑誌名 European Journal of Pharmacology に発表 発表予定

(巻・号・頁) ( 195 ・ 3 ・ 317 ~ 321 )

発行年月 1991 年 4 月

題 目 Allosteric interaction of trimebutine maleate with  
-----  
dihydropyridine binding sites

著 者 名 Nagasaki, M., Kurosawa, H., Naito, K. and Tamaki, H.

学術雑誌名 European Journal of Pharmacology に発表 発表予定

(巻・号・頁) ( 189 ・ 1 ・ 71 ~ 76 )

発行年月 1990 年 7 月

題 目 Effect of trimebutine on contractile responses in skinned  
-----  
ileal smooth muscle

著 者 名 Nagasaki, M., Itagaki, M., Komori, S. and Ohashi, H.

学術雑誌名 Japanese Journal of Pharmacology に発表 発表予定

(巻・号・頁) ( 65 ・ 3 ・ 249 ~ 255 )

発行年月 1994 年 7 月

題 目 Contribution of peripheral opioid receptors to the trimebutine  
-----  
-induced contractions of the proximal colon in anesthetized rat

著 者 名 Nagasaki, M., Yamada, K., Ikezawa, K. and Tamaki, H.

学術雑誌名 Japanese Journal of Smooth Muscle Research に発表 発表予定

(巻・号・頁) ( 25 ・ 1 ・ 27 ~ 30 )

発行年月 1989 年 2 月



既発表論文

題 目 Nerve pathways in the rectal region of the nerve of Remak of  
-----  
the chicken

著 者 名 Nagasaki, M., Takewaki, T. and Ohashi, H.

学術雑誌名 Japanese Journal of Veterinary Science に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( 45 ・ 4 ・ 443 ~ 452 )

発行年月 1983 年 8 月

題 目  
-----

著 者 名  
-----

学術雑誌名 に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( . . ~ )

発行年月 年 月

題 目  
-----

著 者 名  
-----

学術雑誌名 に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( . . ~ )

発行年月 年 月

題 目  
-----

著 者 名  
-----

学術雑誌名 に発表・発表予定

(巻・号・頁) ( . . ~ )

発行年月 年 月



消化管平滑筋におけるtrimelbutine  
の作用機構に関する研究

1994年

岐阜大学大学院  
総合数理学部

長崎三坂



②

# 消化管平滑筋におけるtrimebutine の作用機構に関する研究

長 崎 正 明



# 目次

I	緒言	1
II	実験材料及び実験方法	4
1.	使用動物	4
2.	組織標本における張力及び細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の測定法	4
3.	単離細胞における膜電流の測定法	5
4.	細胞膜標本におけるカルシウム拮抗薬受容体結合実験	6
5.	スキンド平滑筋における張力の測定法	7
6.	使用薬物及び試薬	8
7.	統計処理法	8
III	実験結果	9
1.	モルモット盲腸縦平滑筋の張力及び細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度変化に対する trimebutineの作用	9
1)	脱分極筋の収縮に対する作用	9
2)	$Ca^{2+}$ 除去下の carbachol誘発収縮に対する作用	12
3)	自発性収縮に対する作用	14
2.	ウサギ回腸縦走筋細胞の膜電流に対する trimebutineの作用	15
1)	電位依存性カルシウム電流に対する作用	15
2)	電位依存性カリウム電流に対する作用	23
3)	膜電位及び膜抵抗に対する作用	29
3.	モルモット回腸縦走筋膜標本における [ $^3H$ ]nitrendipine結合に対する trimebutineの作用	32



4.	モルモット回腸縦走筋のスキンド標本における張力変化に対する trimebutineの作用 -----	35
1)	Carbacholによる細胞内カルシウム貯蔵部からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対する 作用 -----	35
2)	Caffeine及び inositol 1,4,5-trisphosphateによる細胞内カルシウム貯蔵部 からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対する作用 -----	37
3)	収縮系の $\text{Ca}^{2+}$ 感受性に対する作用 -----	37
I V	考 察 -----	41
1.	電位依存性カルシウムチャンネルに対する作用 -----	41
2.	電位依存性カリウムチャンネルに対する作用 -----	43
3.	細胞内カルシウム貯蔵部からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対する作用 -----	45
4.	消化管運動に対する trimebutineの二面的な作用について -----	47
V	結 論 -----	49
謝 辞	-----	51
引用文献	-----	52



# I 緒言

Trimebutine maleate ((±)-2-dimethylamino-2-phenylbutyl 3,4,5-trimethoxybenzoate hydrogen maleate : 以下 trimebutine と略す) (Fig.1) は 1970年フランス Jouveinal社において一連のアミノエステル誘導体より開発された消化管運動機能調整薬であり、日本では田辺製薬(株)が独自の合成法を確立して研究・開発を行い、1984年に上市した。本薬は、慢性胃炎における消化器症状、すなわち、腹部疼痛、悪心、おくび及び腹部膨満感、そして過敏性腸症候群における下痢及び便秘などの症状緩解に臨床上有用であることが認められている(1, 45, 47, 74)。このように、trimebutineは消化管運動機能の病的な低下あるいは亢進時に認められる症状のいずれも改善するという調整的な効果を有する薬物である。このような効果は trimebutineが消化管運動機能の低下時には運動亢進作用を、逆に亢進時には抑制作用を発現することに基づくことが臨床薬理学的研究によって明らかにされている(18, 26, 46, 63)。しかし、その作用機序は解明されていない。

モルモットあるいはウサギの摘出消化管標本においても、trimebutineは筋緊張あるいは収縮活性の低い標本では自発運動亢進作用を、収縮活性の高い標本では抑制作用をそれぞれ示す(66, 67, 69)。この二面的な効果は tetrodotoxin、atropine、 $\alpha$  及び  $\beta$  アドレナリン受容体遮断薬の存在下でも認められることから(66, 67, 69)、trimebutineが平滑筋に直接作用して発現すると考えられている。

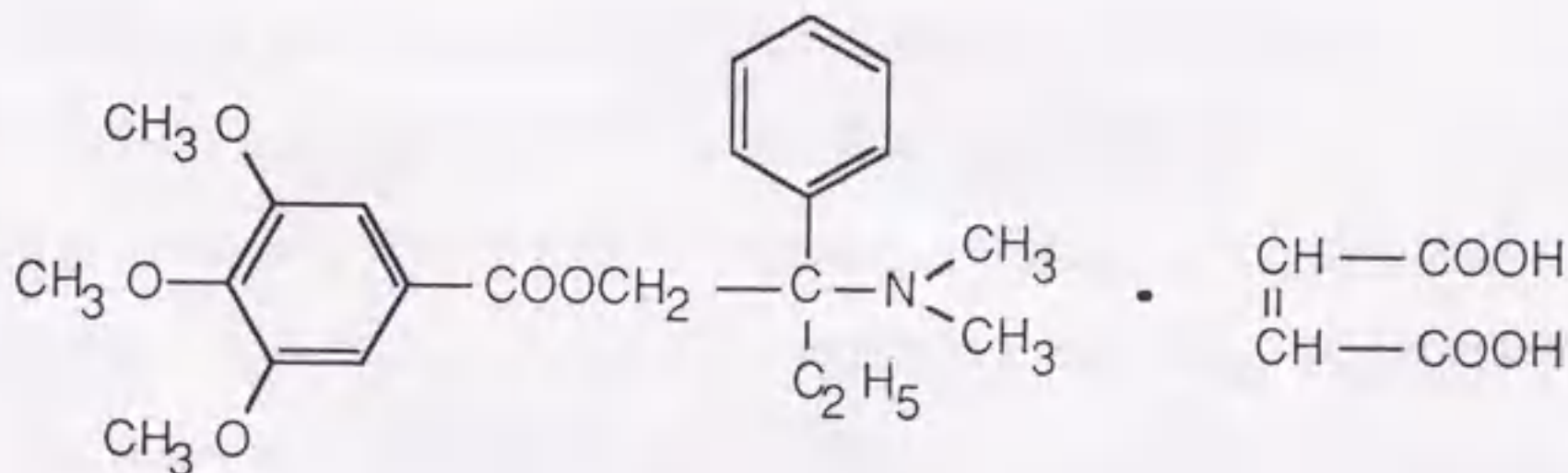


Fig.1 Chemical structure of trimebutine maleate.



Trimebutineの消化管平滑筋に対する抑制効果について、モルモット摘出胃前庭部標本の自発運動に対する抑制作用が外液の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を高めることによって発現しなくなること (66)、摘出胆嚢の脱分極筋における  $\text{Ca}^{2+}$ により誘発される収縮の濃度反応曲線を本薬が高濃度側へ平行移動すること (68) から、竹永ら (66, 68) は平滑筋細胞膜を介する  $\text{Ca}^{2+}$ の流入を阻害する作用により発現すると主張した。Furukawa and Kimoto (20) は trimebutineがモルモット胃前庭部輪状筋標本の収縮を抑制することを観察し、trimebutineが化学構造において procaineと類似していることに基づいて、procaineと同様に細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の抑制作用 (10) と、細胞内カルシウム貯蔵部 (Ca貯蔵部) からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の抑制作用 (29, 33) を有しており上述のような効果を示したと推論した。

一方、摘出消化管標本に対する trimebutineの亢進性効果は、栄養液から  $\text{Ca}^{2+}$ を除去することや Ca拮抗薬で処置することにより消失し、反対に栄養液の  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を高めることにより増大することが報告されている (67, 68)。また、モルモット胃前庭部輪状筋標本において、trimebutineは細胞膜の  $\text{K}^{+}$ 透過性を減少させることによって脱分極を生じ、活動電位 (スパイク電位) の振幅を増大させ、そして slow waveの放電頻度を規則的にすることも観察されている (20)。これらの事実は、trimebutineが消化管平滑筋の細胞膜を脱分極させてスパイクの発生頻度を高めるとともに再分極相での  $\text{K}^{+}$ チャンネルの開口を抑制することにより持続時間を延長させたために起こる電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加により亢進性効果を発現することを示唆している。

上述したように trimebutineは、消化管平滑筋細胞の膜に存在する  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル及び  $\text{K}^{+}$ チャンネル、細胞内 Ca貯蔵部などの機能に影響を及ぼすことが推測される。本研究では、trimebutineの作用機序を解明することを目的として、近年開発された種々の実験手法を用いてこれらの点について検討した。すなわち、平滑筋細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対する作用については電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 電流と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を指標に検討し (49, 50)、更に、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを構成する蛋白質と本薬との



相互作用を受容体結合実験により検討した (52)。K<sup>+</sup>チャンネルに対する作用については電位依存性 K<sup>+</sup>電流を指標に検討した (51)。細胞内 Ca貯蔵部からの Ca<sup>2+</sup>遊離や収縮系の Ca<sup>2+</sup>感受性に及ぼす影響については細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の測定及び化学的処理により細胞膜に小孔を開けた平滑筋組織標本 (スキンド平滑筋標本) における収縮反応により検討した (48, 49)。



## I I 実験材料及び実験方法

### 1. 使用動物

Hartley系モルモット（♂、体重 250～420 g）及び日本白色種ウサギ（♂、体重 1.5～2.5 kg）を使用した。

### 2. 組織標本における張力及び細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の測定法

後頭部を強打して失神させ、放血死させたモルモットから盲腸紐を摘出した。張力だけを測定する場合は長さ 10～15 mmの組織片とし、37 °Cに保温した高濃度  $\text{K}^+$ を含む  $\text{Ca}^{2+}$ 除去栄養液（mM: NaCl 20.9; KCl 105.9;  $\text{MgCl}_2$  1.2; glucose 11.1; HEPES 10.0; pH 7.4）15 mlを満たした浴槽中に懸垂して混合ガス（95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ）を通気した。標本の一端を糸で等尺性張力変換器（UL-10GR; 新興通信）に接続し、発生張力をペン書きオシログラフ上に記録した。

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と張力とを同時に記録する場合は長さ 5～7 mm、幅 0.5～0.8 mmの筋条片を作製し、通気した正常栄養液（mM: NaCl 145; KCl 5;  $\text{CaCl}_2$  2;  $\text{MgCl}_2$  1; glucose 10; HEPES 10; 1 N NaOH にて pH 7.4に調整）を満たした容量 3 mlの石英ガラスキューベット（日本分光）に懸垂した。5  $\mu\text{M}$  fura-2 acetoxymethylester (fura-2/AM) を含む栄養液中で室温下に 1～2時間放置した。fura-2/AMが細胞内へ取り込まれることを促進するために、細胞障害性の弱い界面活性剤である cremophor EL (0.2 %) を同時に加えた。fura-2/AMで処置し終わった標本は約 15分間正常栄養液で洗浄した。ガラスキューベットを細胞内カルシウム測定装置（CAF-100; 日本分光）に装着し、二波長（340, 380 nm）、48 Hzで fura-2 の蛍光を励起して 500 nmの蛍光（F<sub>340</sub>, F<sub>380</sub>）及びこれらの比（ $R_{340/380}$ ）を記録した。 $R_{340/380}$ を細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の相対値として用いた（27）。測定される総蛍光量にバックグラウンドの蛍光が含まれること（44）と細胞質における fura-2の解離定数が不明である（37）ことから細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の絶対値は求めなかった。高濃度の  $\text{K}^+$ （10～80 mM）を含む栄養液は、正常栄養液中の NaClを等モルの



KClで置換し、Ca<sup>2+</sup>除去液は80 mM K<sup>+</sup>を含む栄養液からCaCl<sub>2</sub>を除き、等モルのMgCl<sub>2</sub>と1 mM EGTAを加えることにより調製した。実験は一部のものを除いて20～22℃で行った。

### 3. 単離細胞における膜電流の測定法

ウサギに過剰量のpentobarbital-Naを耳静脈から投与して致死させた後、回腸を摘出し、長さ5～6 cm、幅0.5～1 cmの縦走筋層を数本剥離した。縦走筋を約2 mm角に細切し、30 μM Ca<sup>2+</sup>を含む栄養液（組成は下に示す）中で37℃10分間温浴した後、collagenase（0.5～0.8 mg/ml）、papain（12～15 U/ml）及びbovine serum albumin（2 mg/ml）を含む30 μM Ca<sup>2+</sup>を含む栄養液中で37℃、30～40分間酵素処理した。その後、組織片を120 μM Ca<sup>2+</sup>を含む栄養液中に移し、先端を丸めたガラスピペット（先端径2～3 mm）でゆっくりピペッティングすることにより細胞を遊離させた。こうして得た細胞浮遊液を150 μm格子のナイロンメッシュで濾過した後100×gで2分間遠心分離して上清を捨て、細胞を0.8 mM Ca<sup>2+</sup>を含む栄養液に浮遊させた。この浮遊液を丸型カバーガラス（直径15 mm）に滴下して、プラスチックシャーレ中で保湿下に4℃で保存した。

細胞の膜電流及び膜電位はパッチクランプ法（25）により、室温で導出し、パッチ／ホールセルクランプ増幅器（日本光電CEZ-2300）を介してデータレコーダー（TEAC RD-101T）に保存するとともに、サーマルアレイレコーダー（日本光電RTA-1100）上に記録した。パッチ電極用ピペット（成茂科学GD-1.5）はピペット内用溶液（ピペット液）を充填した状態で4～7 MΩの抵抗のものを使用した。

栄養液およびピペット液の組成は以下のとおりである。

栄養液（mM）：NaCl 126; KCl 6; CaCl<sub>2</sub> 2; MgCl<sub>2</sub> 1.2; glucose 14; HEPES 10.5、1 N NaOHにてpH 7.2に調整した。30 μM、120 μM及び0.8 mM Ca<sup>2+</sup>を含む栄養液は、CaCl<sub>2</sub>をそれぞれの濃度に調整した。

ピペット液（mM）：KCl 134; MgCl<sub>2</sub> 1.2; ATP 1; GTP 0.1; EGTA 0.05; glucose 14;



HEPES 10.5、1 N NaOH を用いて pH 7.2 に調整した。

Ca<sup>2+</sup>電流を記録する場合は、外向き K<sup>+</sup>電流を抑制する目的でピペット液の KCl を CsCl に置換した。また、Ca<sup>2+</sup>非依存性 K<sup>+</sup>電流を記録する場合は栄養液の CaCl<sub>2</sub> を MnCl<sub>2</sub> で置換し、ピペット液の EGTA を 10 mM に増加した。

#### 4. 細胞膜標本におけるカルシウム拮抗薬受容体結合実験

平滑筋細胞膜標本は Bolger ら (8, 9) の方法に準じて作製した。モルモットを放血致死させた後回腸を摘出し、縦走筋層を剥離して 0.5~1 g の縦走筋を氷冷した栄養液中に集めた。これをハサミで細切し、10~20 倍量 (volume/組織湿重量) の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、Potter 型ガラス・テフロンホモジナイザー (setting 6) を 8 回上下させてホモジナイズした。ホモジネートを 1,100 × g で 20 分間遠心分離し、その上清を 10,000 × g で 10 分間遠心分離した。更に、その上清を 45,000 × g で 45 分間遠心分離し、沈澱に 50 mM Tris-HCl 緩衝液を 8 mg 組織湿重量/ml の濃度となるように加え、懸濁化して受容体結合実験のための膜標本とした。以上の操作は全て 4 °C で行った。標本の蛋白濃度は牛血清アルブミンを標準品として Lowry らの方法 (43) により測定した。

結合飽和実験では、膜標本 (1 ml) に種々の濃度の [<sup>3</sup>H]nitrendipine (最終濃度 0.02~1 nM) を加え (総容量 1.1 ml)、25 °C で 60 分間温浴した。反応は氷冷した Tris-HCl 緩衝液 8 ml を加えることにより停止した。ついで、膜標本に結合した [<sup>3</sup>H]nitrendipine を分離するために、反応液を減圧下にグラスファイバー濾紙 (Whatman GF/C) を介して濾過した。濾紙上の膜標本に結合した [<sup>3</sup>H]nitrendipine の放射能を toluene-Triton X-100 系シンチレーターを用い、液体シンチレーション・スペクトロメーター (Packard 460CD) で測定した。特異的 [<sup>3</sup>H]nitrendipine 結合は、競合薬物が存在しない場合の [<sup>3</sup>H]nitrendipine 結合量 (総結合) から (±)-nitrendipine の過剰量 (100 nM) が存在する場合の結合量 (非特異的結合) を差し引くことにより求めた。本実験における特異的結合は総結合の 60-85 % であった。



結合阻害実験では、膜標本 (1 ml) を [<sup>3</sup>H]nitrendipine (最終濃度 0.1 nM, 50 μl) と種々の濃度の被検薬物 (50 μl) とともに温浴し、特異的結合は上述の方法で求めた。nitrendipineの分解を防止する目的で、結合実験は純黄色ランプ (ナショナル FL40SY-F) 下で行った。

膜標本の結合部位における [<sup>3</sup>H]nitrendipineの平衡解離定数 (KD値) と最大結合量 (B<sub>max</sub>値) は、コンピューター (SORD M343) を用いた Scatchard解析により求めた。放射性リガンド結合阻害曲線の 50%抑制濃度 (IC<sub>50</sub>値) は、X軸に被検薬物の濃度の対数 (log C)、Y軸に log[D/(S-D)]をプロット (pseudo Hill plot) したときの回帰曲線と X軸との交点から求めた。Dおよび Sはそれぞれ被検薬物が存在あるいは存在しない場合の特異的結合量である。阻害曲線の傾き (b, Hill係数) は、次に示した 4係数の logistic曲線から求めた (15) : 
$$Y = \frac{a - d}{1 + (X/c)^b} + d$$
 Yは、被検薬物の濃度が Xの時の [<sup>3</sup>H]nitrendipineの特異的結合である。cは IC<sub>50</sub>値、aと dはそれぞれ X=0と X=∞の時の [<sup>3</sup>H]nitrendipineの結合量を示す。また、被検薬物の結合阻害定数 (K<sub>i</sub>値) は IC<sub>50</sub>値から次式に従って算出した (13) : 
$$K_i = IC_{50} / (1 + L / K_D)$$
 ここで Lは放射性リガンドの濃度である。

##### 5. スキンド平滑筋における張力の測定法

モルモットを放血致死させた後回腸部を約 5 cm摘出し、縦走筋層を剥離した。この縦走筋層から長さ約 7 mm、幅約 0.5 mmの縦走筋標本を作製し、両端 1 mmをアルミ箔の小片 (1×3 mm、2×3 mm) に挟み、圧迫固定した。一端のアルミ箔 (1×3 mm) にピンを刺して栄養液 (約 0.3 ml) を満たした浴槽底部のゴム板に固定し、他端のアルミ箔にピンで穴をあけて等尺性張力変換器 (日本光電 TB-612T) のフックを通し、約 150 mgの負荷をかけた。張力は増幅器 (日本電気三栄 AS 1202) を介して、ペン書きオシログラフ (日立 561) 上に記録した。実験は 23°Cで行った。

栄養液中に 30~60 分放置した標本に carbachol (10 μM) を適用して収縮の反応性を確認した。次いで浴槽内液を弛緩栄養液 (mM: K propionate 130; MgCl<sub>2</sub> 4; EGTA 4;



Tris-maleate 20; Na<sub>2</sub>ATP 4; creatine phosphate 10; creatine phosphokinase 3.3 U/ml; pH 6.8)

(55) に置換して、標本を 10~20 分間平衡化させた。同栄養液中に最終濃度 40  $\mu$ M となるように  $\beta$ -escin を添加して、20~30 分間標本を処置することによって細胞膜に細孔の開いたスキンド標本を作製した (40)。また、一部の実験では筋小胞体の機能を除外するために、更に A23187 (10  $\mu$ M) で 10 分間処置した。

カルシウム標準液中の Ca<sup>2+</sup>濃度は、Ca<sup>2+</sup>-EGTA緩衝液として調製した。すなわち、弛緩栄養液中の EGTA濃度を 4 mMから 2 mMに低下し、100 mM CaCl<sub>2</sub>溶液の必要量を添加することにより決定した。CaCl<sub>2</sub>の必要量は、栄養液のイオン強度を 0.16、pH 6.8として、23 °Cにおける Ca<sup>2+</sup>と EGTAとの見かけ上の親和定数 (約 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>) に基づいて算定した。例えば 1  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>の場合、CaCl<sub>2</sub>濃度は 1 mMである。

## 6. 使用薬物及び試薬

使用薬物は、adenosine-5'-triphosphate (ATP; SIGMA)、bovine serum albumin (和光純薬)、 $\beta$ -escin (SIGMA)、carbamylocholine chloride (carbachol; 東京化成)、caffeine (和光純薬)、collagenase (天野製薬)、cremophor EL (ナカライテスク)、fura-2 acetoxymethylester (同仁化学)、guanosine 5'-triphosphate (GTP; SIGMA)、guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTP $\gamma$ S; SIGMA)、D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>; 同仁化学)、[<sup>3</sup>H]nitrendipine (74 Ci/mmol; New England Nuclear)、(±)-nitrendipine (田辺製薬・有機化学研究所にて合成)、papaine (type III; SIGMA)、tetraethylammonium chloride (TEA; 和光純薬)、tetrodotoxin (TTX; 三共)、trimebutine maleate (田辺製薬) 及びverapamil hydrochloride (ナカライテスク) である。その他の試薬は市販の特級品を用いた。

## 7. 統計処理法

実験成績をまとめた数値は平均値とその標準誤差で示した。統計学的有意差の検定は Student の t-testを用いて行い、P<0.05を統計学上の有意水準とした。



## III 実験結果

### 1. モルモット盲腸紐平滑筋の張力及び細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化に対する trimebutine の作用

#### 1) 脱分極筋の収縮に対する作用

緒言で述べたように、trimebutine は消化管平滑筋の細胞膜を介する  $\text{Ca}^{2+}$  の流入を抑制するという考えが提唱されている (66, 68)。この点について、摘出平滑筋組織標本の収縮反応と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変化を測定する方法で検討した。収縮は、高濃度  $\text{K}^+$  を含む栄養液で膜を脱分極させることによって電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを開口させ、これを通して流入する  $\text{Ca}^{2+}$  により惹起した。

あらかじめ高濃度の  $\text{K}^+$  を含む  $\text{Ca}^{2+}$  除去栄養液に浸漬した盲腸紐標本は  $\text{CaCl}_2$  溶液を添加することによって栄養液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を高めると、持続的な収縮反応を惹起した。

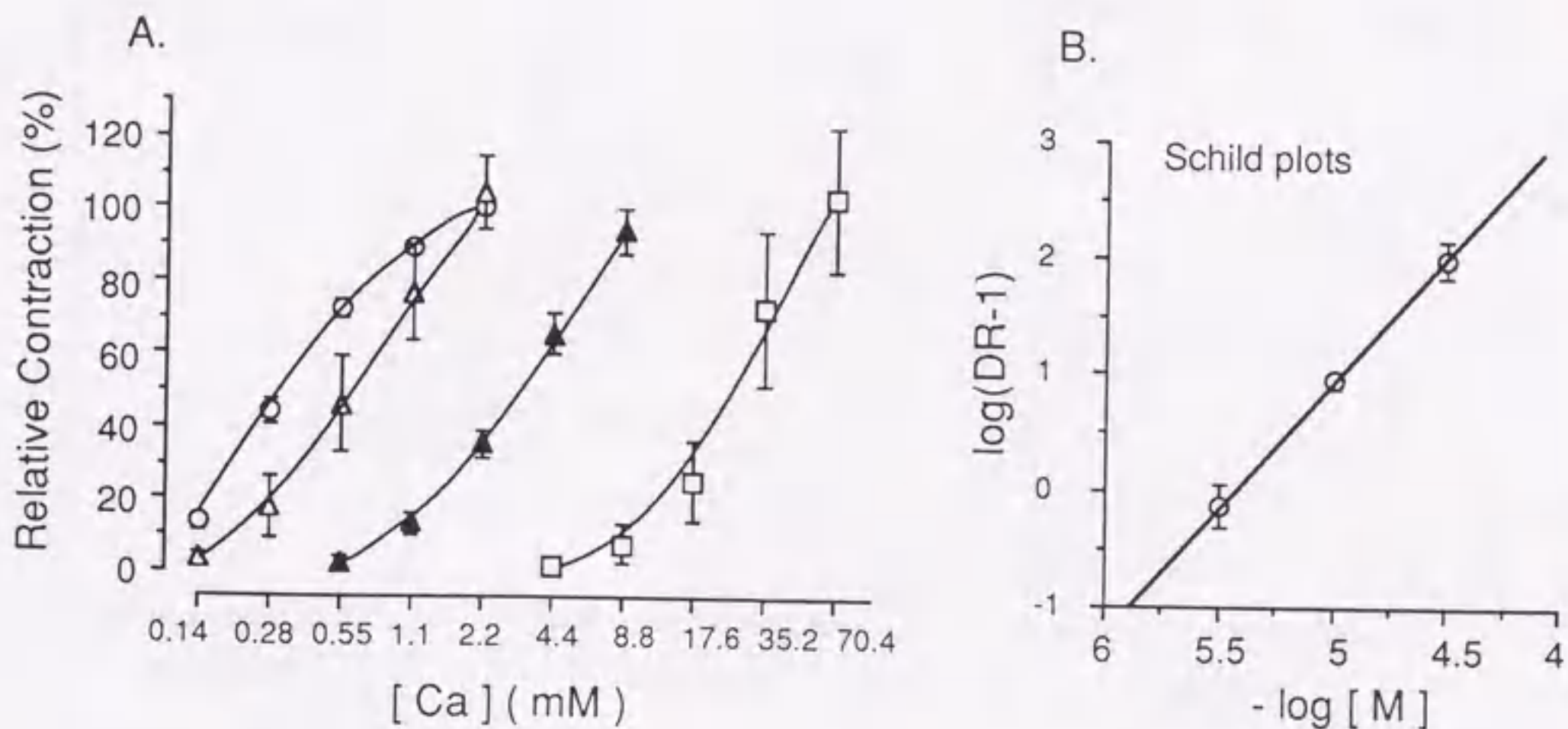


Fig.2 Antagonistic effect of trimebutine on the contractile response of guinea-pig taenia cecum to  $\text{CaCl}_2$ . (A)  $\text{CaCl}_2$  was cumulatively added to the  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution containing 106 mM KCl. The amplitude of the contractile response to  $\text{CaCl}_2$  at the concentration of 2.2 mM was normalized as 100%. Each value is the mean  $\pm$  S.E.M. of three or four experiments.  $\circ$ , Control;  $\triangle$ , 3  $\mu\text{M}$ ;  $\blacktriangle$ , 10  $\mu\text{M}$ ;  $\square$ , 30  $\mu\text{M}$  trimebutine. (B) Schild plots of the data.



Fig.2Aは、CaCl<sub>2</sub>濃度を累積的に高めたときの濃度収縮反応関係に対する trimebutine (3~30 μM) の作用を示す。図から明らかなように trimebutineは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。この効果について Schildプロットした直線の傾きは2.1であった (Fig.2B) . 直線の傾きが1.0より大きいことは、trimebutineが Ca<sup>2+</sup>が誘発する収縮を非競合的に抑制することを示唆する。

Fura-2で前処置した盲腸縦走筋標本において、浴槽液を正常栄養液から 2 mM Ca<sup>2+</sup>を含む 80 mM K<sup>+</sup>栄養液に置換すると、一過性とそれに続く持続性の二つの成分からなる R<sub>340/380</sub>の上昇とそれぞれの成分に対応した収縮反応が惹起された (Fig.3A) 。この一連の操作を繰り返した時、これらの反応は安定した再現性を示した。

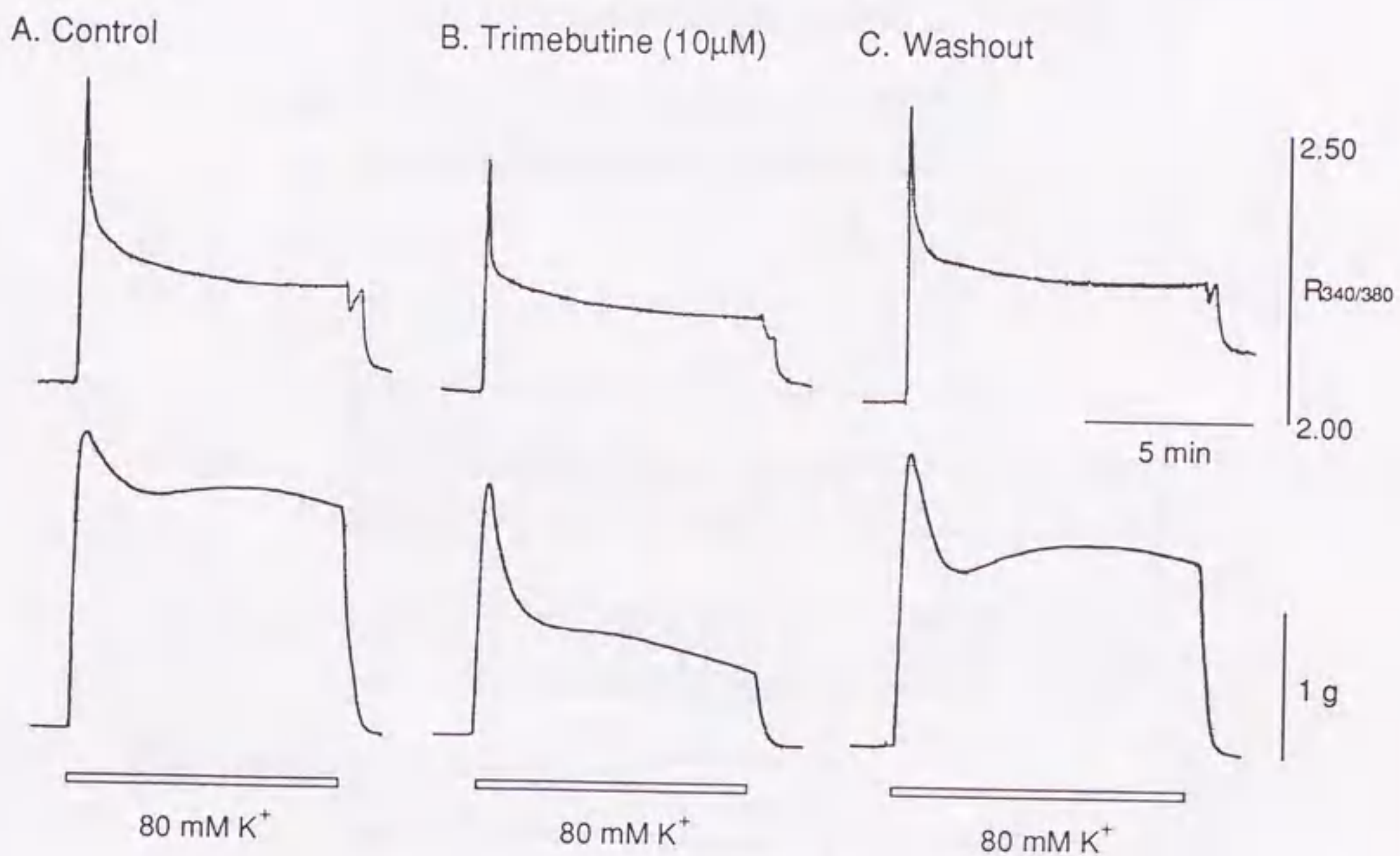


Fig.3 Effect of trimebutine on high K<sup>+</sup> (80 mM)-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (upper trace, indicated by the ratio of F<sub>340</sub> to F<sub>380</sub>) and force (lower trace) transition in fura-2 loaded guinea-pig taenia cecum. (A) Control records; (B) records 10 min after addition of 10 μM trimebutine; (C) records 30 min after washout of the drug.



Trimebutine (10  $\mu$ M) は R340380の上昇反応と収縮反応の振幅をいずれも抑制し (Fig.3B)、この効果は薬物を洗浄除去することによりほぼ完全に消失した (Fig.3C)。一過性の R340380の上昇と収縮の振幅は trimebutine (10  $\mu$ M) によりそれぞれ投与前値の  $72.7 \pm 5.6$  と  $76.7 \pm 2.9$  %に減少した (Fig.4A)。一方、持続性の R340380の上昇と収縮の振幅は、それぞれ  $53.4 \pm 6.7$ と  $34.5 \pm 7.0$  %に減少した (Fig.4B)。

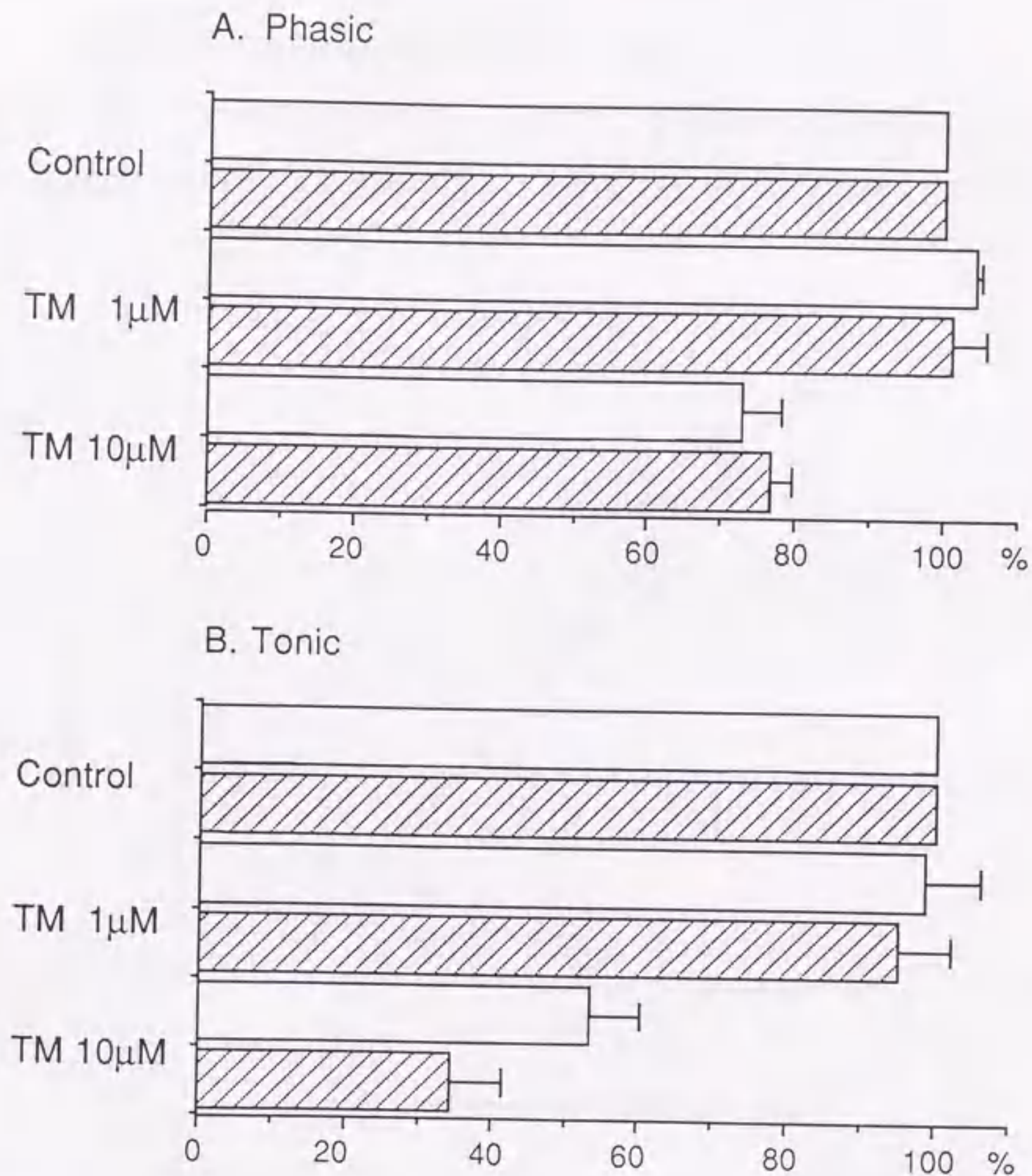


Fig.4 Effect of trimebutine (1, 10  $\mu$ M) on phasic (A) and tonic (B) components of high  $K^+$ -induced responses. The bars show the amplitude of the fluorescence (R340380, open) and tension (shaded) responses as a percent of each control response to 80 mM  $K^+$ , and represent the mean  $\pm$  S.E.M. of five experiments.



両反応における一過性の成分は置換用の栄養液に含まれる  $K^+$  濃度を 10 mM あるいはそれ以上に増加するに伴って増大した。10、20 及び 40 mM  $K^+$  におけるそれぞれの R340/380 の上昇と収縮反応の振幅との関係を Fig.5 に示す。Trimebutine (10  $\mu$ M) は両反応間の関係を変えないので、脱分極刺激による収縮においては収縮系の  $Ca^{2+}$  感受性に影響を及ぼさないと考えられる。

## 2) $Ca^{2+}$ 除去下の carbachol 誘発収縮に対する作用

高濃度  $K^+$  を含む  $Ca^{2+}$  除去栄養液中で carbachol により誘発される収縮は細胞内  $Ca$  貯蔵部から遊離される  $Ca^{2+}$  によるものであることが知られている (12, 57)。

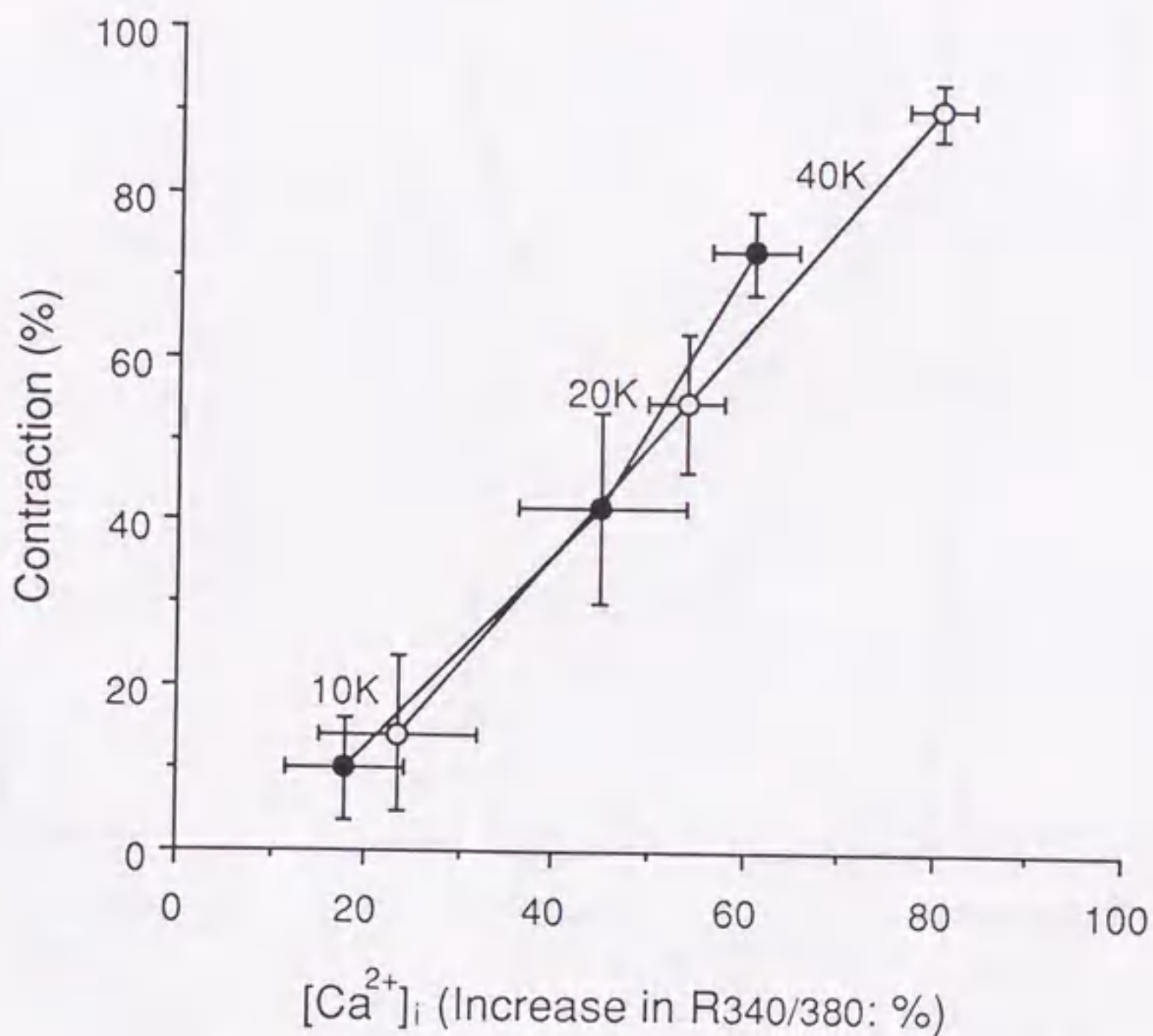


Fig.5 The relationship between the increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and tension of phasic responses induced by 10, 20 and 40 mM  $K^+$  in the absence (control, ○) or presence of 10  $\mu$ M trimebutine (●). The peak amplitude of contraction induced by each concentration of  $K^+$  was expressed as a percent of the 80 mM  $K^+$ -induced control response (ordinate). The peak increase in the R340/380 ratio induced by each concentration of  $K^+$  was expressed as a percent of the 80 mM  $K^+$ -induced control response (abscissa). Each value is the mean  $\pm$  S.E.M. of five experiments.



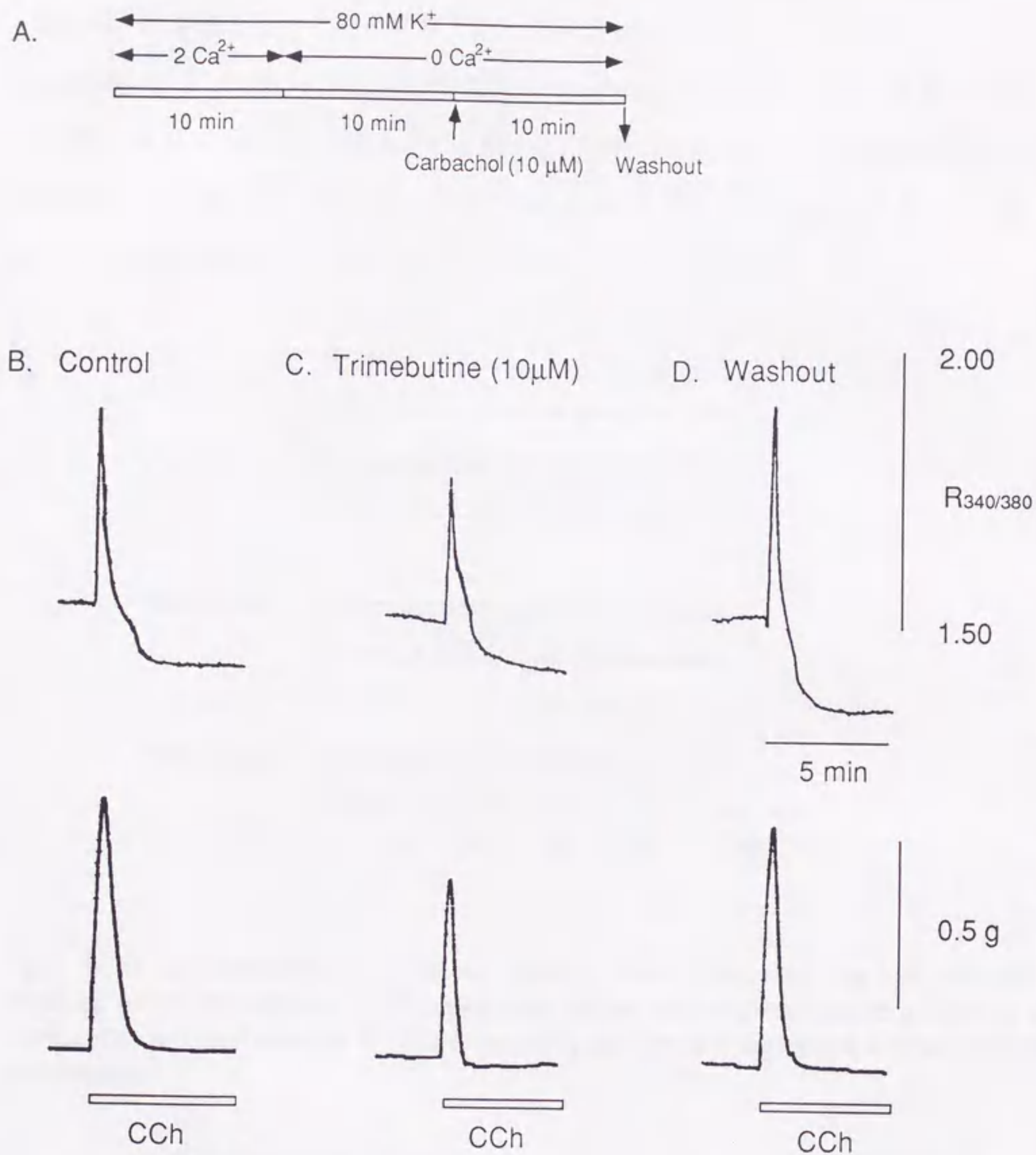


Fig.6 Effect of trimebutine on carbachol-induced  $[Ca^{2+}]_i$  (upper trace) and force (lower trace) transition in high  $K^+$  and  $Ca^{2+}$ -free medium. (A) Experimental protocol. Experiments were carried out in 80 mM  $K^+$  medium. Muscle strips were loaded with  $Ca^{2+}$  (2 mM) for 10 min and equilibrated for next 10 min in  $Ca^{2+}$ -free medium, then stimulated by carbachol (10  $\mu$ M) for 10 min, after which carbachol was washed out. This protocol was repeated until the carbachol-induced responses became stable. (B) Control records; (C) records after 10 min treatment with 10  $\mu$ M trimebutine; (D) records 30 min after washout of the drug.



Ca<sup>2+</sup>をあらかじめ細胞内 Ca貯蔵部に負荷した標本において、上述の条件下で carbachol (10 μM) を適用すると、一過性の細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇と収縮を生じた (Fig.6B)。実験を行うためのプロトコールは Fig.6Aに示した。

Carbacholによる R<sub>340/380</sub>の上昇と収縮の振幅は trimebutine (10 μM) によりそれぞれ投与前値の 76.6 ± 3.5と 69.3 ± 9.3 %に減少した (Fig.6Cと 7)。この効果は薬物の洗浄除去により消失した (Fig.6D)。一方、procaine (1 mM) は carbacholに対する両反応をほぼ完全に抑制した (図には示していない)。

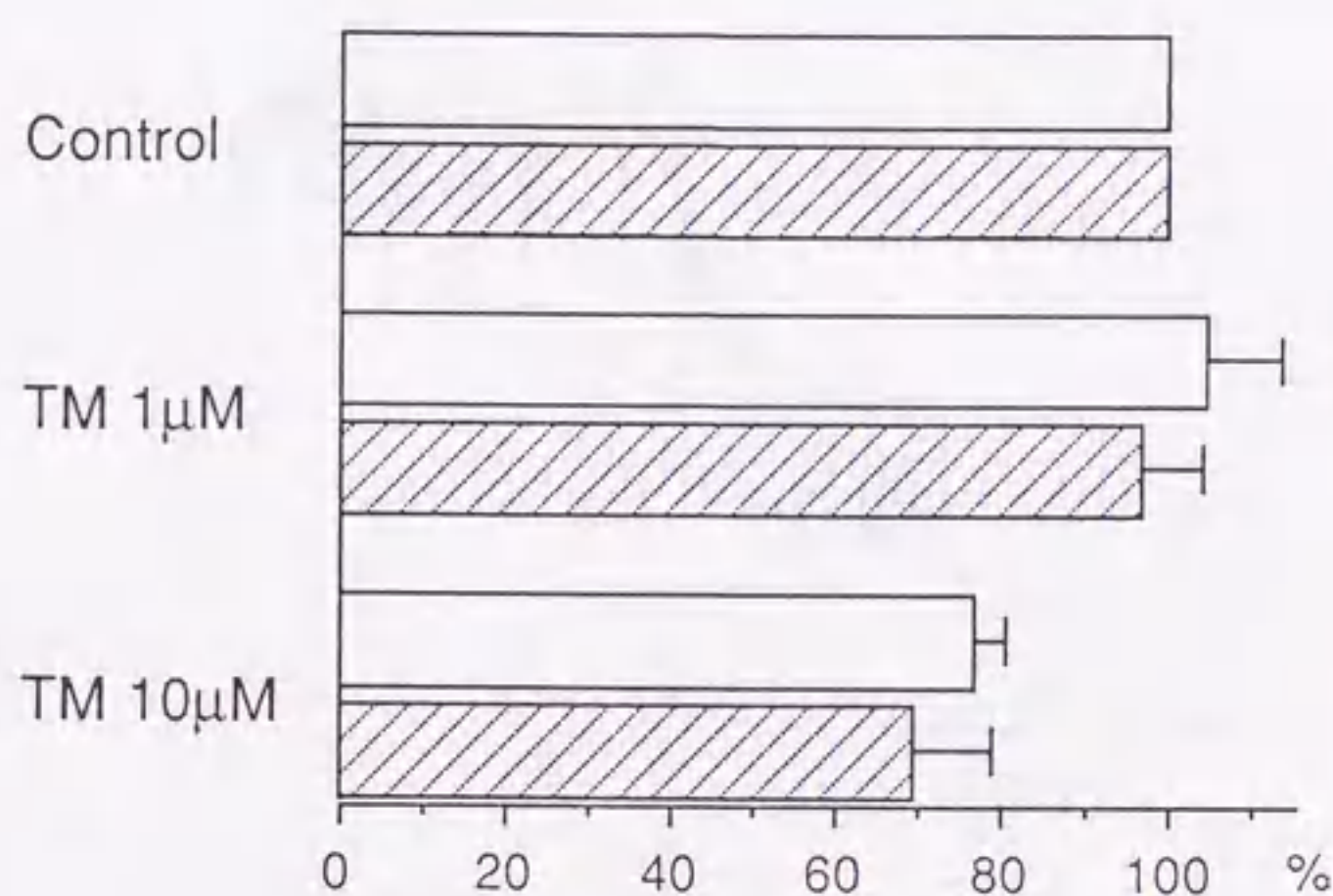


Fig.7 Effect of trimebutine (1, 10 μM) on carbachol-induced responses. The bars show the amplitude of the fluorescence (R<sub>340/380</sub>, open) and tension (shaded) responses expressed as a percent of each control response to 10 μM carbachol, and represent the mean ± S.E.M. of three experiments.

### 3) 自発性収縮に対する作用

盲腸紐標本は、Fura-2 を負荷した後正常栄養液に浸漬し、栄養液の温度を 25~30 °C に保つと細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度と張力の自発的な変動を示した (Fig.8)。この変動は tetrodotoxin (0.3 μM) で処置することにより全く影響を受けなかったことから、筋原性であることが分かる。Trimebutine (10 μM) は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度と張力の自発的な



変動を消失させ、加えてそれぞれの基底値をも低下させた (Fig.8)。

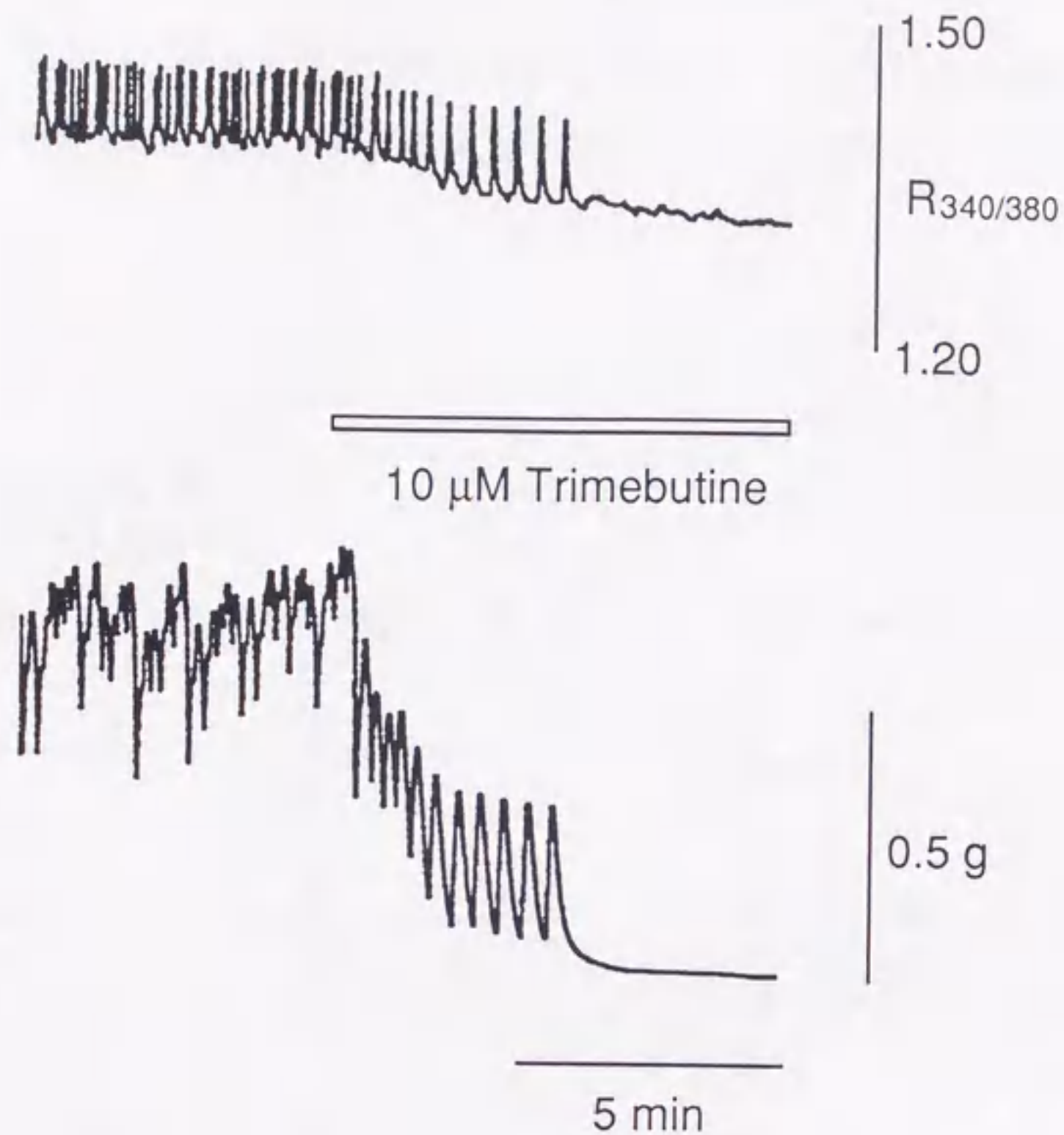


Fig.8 Effect of trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) on the spontaneous fluctuations in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (upper trace) and motility (lower trace) of the taenia cecum in the presence of tetrodotoxin ( $0.3 \mu\text{M}$ ).

## 2. ウサギ回腸縦走筋細胞の膜電流に対する trimebutine の作用

### 1) 電位依存性カルシウム電流に対する作用

これまでの実験結果から、trimebutineは膜の脱分極による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇と張力の増大を抑制するので、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに作用して  $\text{Ca}^{2+}$ の流入を抑制することが考えられた。このことを確かめる目的で、単一平滑筋細胞における電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する trimebutineの作用を検討した。



単一平滑筋細胞を CsCl を充填したパッチピペットを用いて、膜電位を -80、-60 あるいは -40 mV (保持電位) に電圧固定した条件下で脱分極パルス (duration, 300 msec) で保持電位から -30 mV あるいはそれ以上の膜電位まで急激に変化させると、Ca<sup>2+</sup> の流入による一過性の内向き電流が誘発された (Fig.9)。この内向き電流は細胞外液に Cd<sup>2+</sup> (100 μM) を添加することにより完全に消失した (Fig.10)。

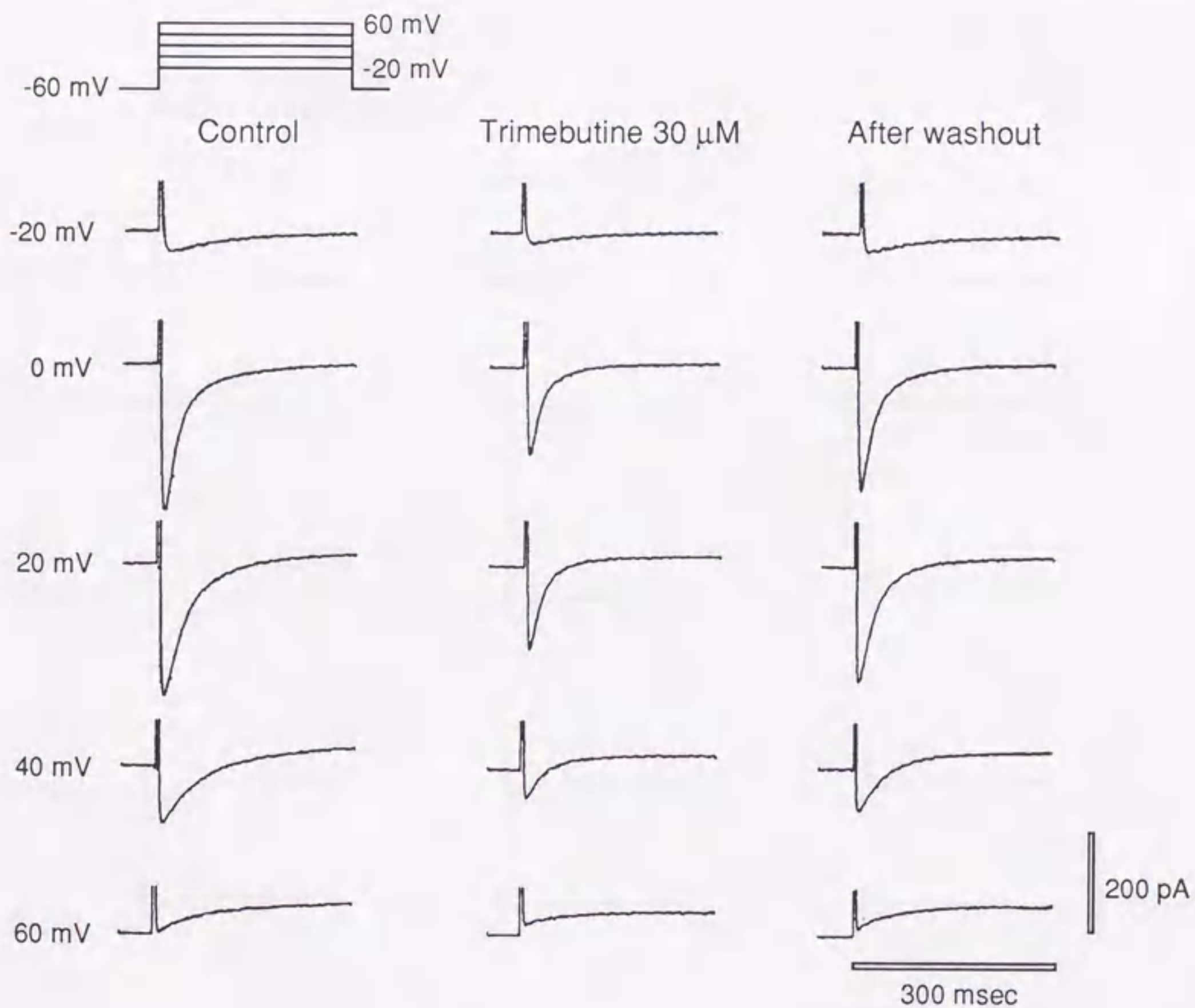


Fig.9 Effect of trimebutine on inward Ca<sup>2+</sup> currents elicited by stepping from the -60 mV holding potential to -20 mV to +60 mV in 20 mV increments for 300 msec in a single Cs-filled cell bathed in physiological salt solution. Current traces before and after addition of trimebutine (30 μM) and after its washout are shown from left to right.



Fig.9は -60 mVの保持電位 から -20 mVと +60 mVの間で 20 mV刻みに増大する脱分極パルスを与えたときに誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する trimebutine ( $30 \mu\text{M}$ ) の作用を示す。Trimebutineにより、いずれの脱分極パルスによって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流もその振幅は減少したが、時間依存性の不活性化過程は変わらなかった (Fig.9)。 $\text{Ca}^{2+}$ 電流は、trimebutineを洗浄除去することにより抑制状態から容易に回復した。保持電位を

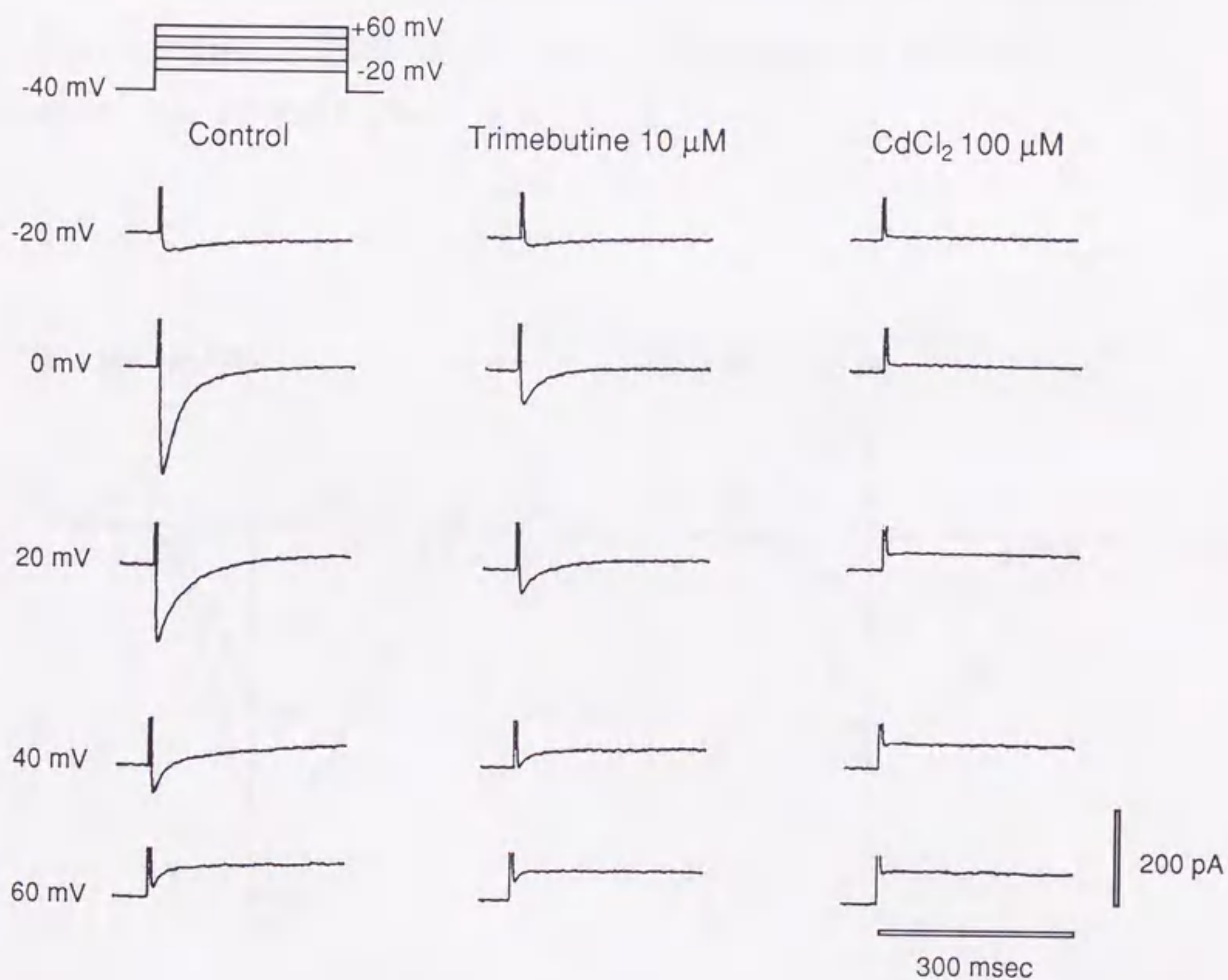


Fig.10 Effect of trimebutine on inward  $\text{Ca}^{2+}$  currents elicited by stepping from the -40 mV holding potential to -20 mV to +60 mV in 20 mV increments for 300 msec. Current traces before and after addition of trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) are shown (left and middle rows). Addition of  $\text{CdCl}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) abolished the inward currents (right row).



-40 mVとして同様の実験を行ってみると、誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流は -60 mVの場合よりも小さく、trimebutineによる抑制を受け易かった (Fig.9と 10)。Fig.11には、保持電位 -60 mVにおける trimebutine 30  $\mu\text{M}$ 適用前後のピーク  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の電流-電圧関係と、保持電位 -40 mVにおける本薬 10  $\mu\text{M}$ 適用前後の同関係を比較してある。Trimebutineの  $\text{Ca}^{2+}$ 電流抑制効果は保持電位にかかわらずすべてのパルス電位において観察されるが、抑制の程度は trimebutineの濃度が低かったにもかかわらず -40 mVの保持電位で大きかった。例えば、-40 mVの保持電位から +10 mVへの脱分極パルスによって誘発されるピーク  $\text{Ca}^{2+}$ 電流は 68 % だけ低下されたのに対して、-60 mVの保持電位から +10 mVへの脱分極パルスによるピーク  $\text{Ca}^{2+}$ 電流は 36 % だけしか低下されなかった。また、Fig.11は、保持電位にかかわらず  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の見かけ上の逆転電位が trimebutineにより移動しないことも示している。

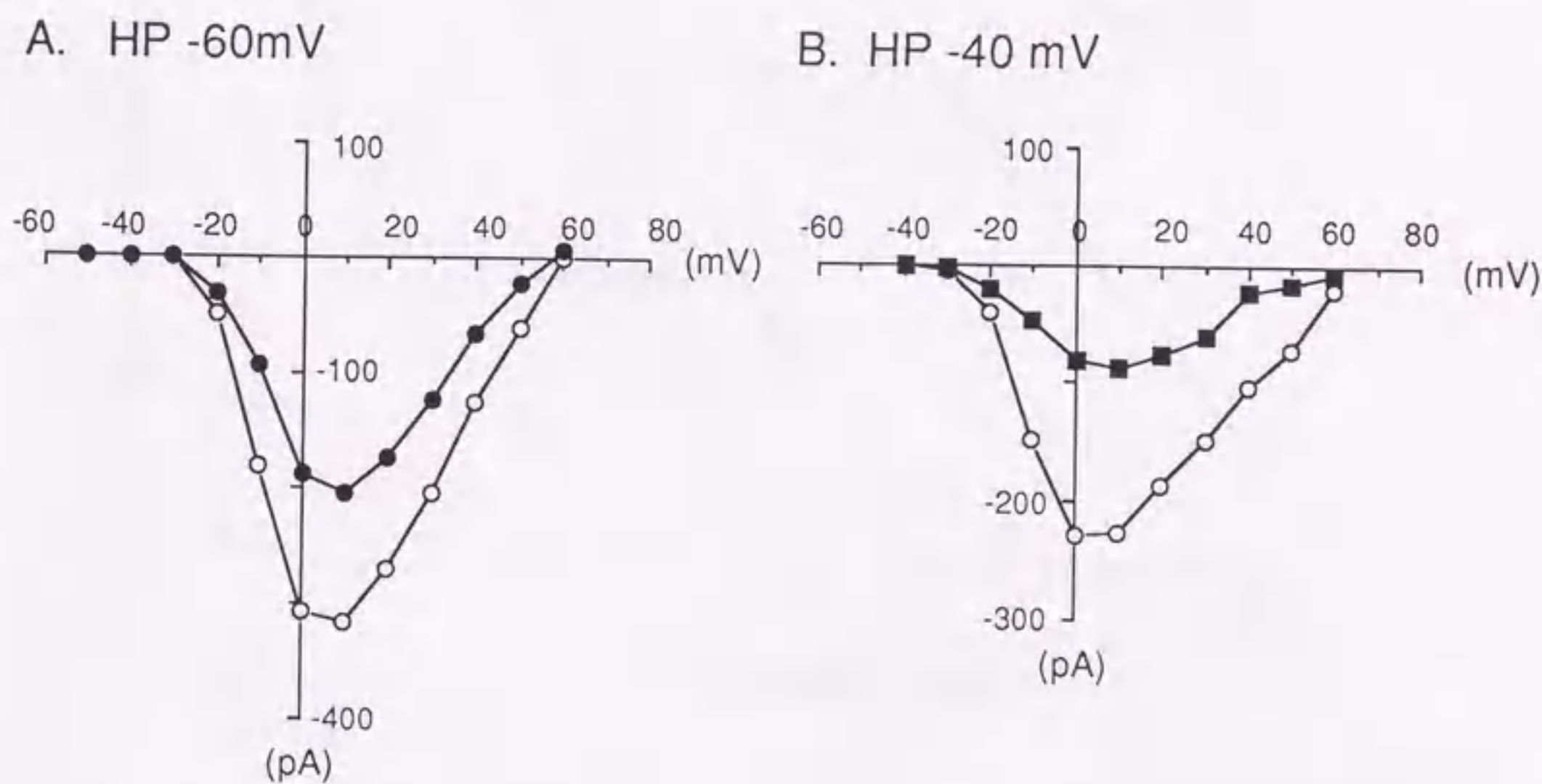


Fig.11 Current-voltage relationships for the peak inward  $\text{Ca}^{2+}$  current activated from the holding potentials of -60 mV (A) and -40 mV (B). The peak amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  current evoked by stepping to different potentials from the holding potential is plotted against the potential. Control ( $\circ$ ) and in the presence of trimebutine (10  $\mu\text{M}$ ,  $\blacksquare$ ; 30  $\mu\text{M}$ ,  $\bullet$ ).



保持電位 -40、-60及び -80 mVから、0 mVへの脱分極パルス (duration, 200 msec) によって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する trimebutineの濃度作用曲線を Fig.12に示す。-40と -60 mVの保持電位で、trimebutine (3~100  $\mu\text{M}$ ) は濃度依存性にピーク電流を減少し、 $\text{IC}_{50}$ 値はそれぞれ  $7.3 \pm 1.2 \mu\text{M}$  (n=6) 及び  $35.8 \pm 6.2 \mu\text{M}$  (n=7) であった。しかし、-80 mVの保持電位では 100  $\mu\text{M}$  trimebutine (本実験で用いた最高濃度) を適用してもピーク電流の減少の大きさは  $35.5 \pm 6.7 \%$  (n=6) であった。以上の結果より、trimebutineの抑制作用は、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流を誘発する前の細胞の膜電位に強く依存していることが明らかになった。

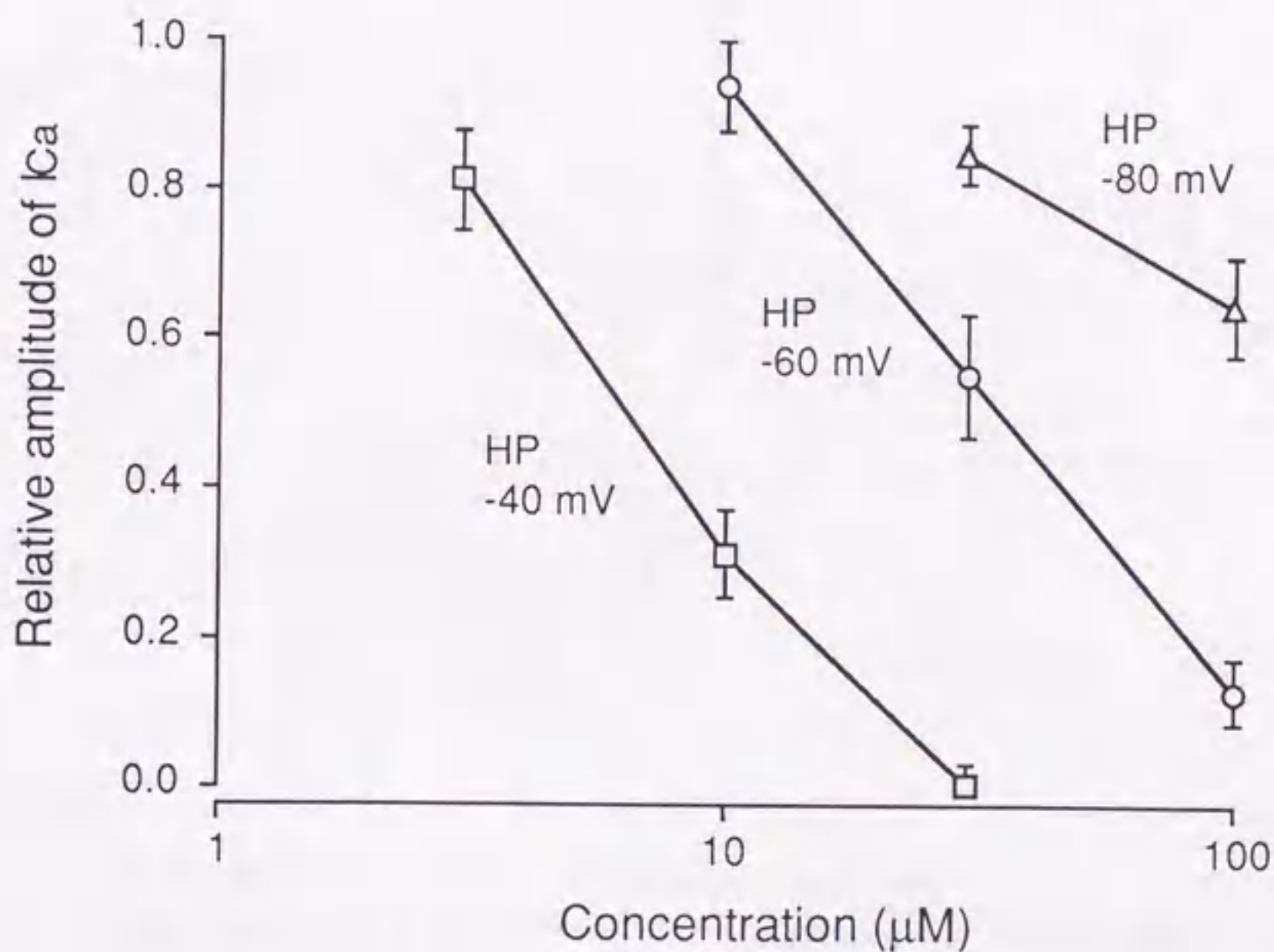


Fig.12 Relationships between the concentration of trimebutine (3-100  $\mu\text{M}$ ) and the relative amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  current activated from three different holding potentials (-40 mV,  $\square$ ; -60 mV,  $\circ$ ; -80 mV,  $\triangle$ ). The  $\text{Ca}^{2+}$  current was evoked by stepping from the holding potentials to 0 mV for 200 msec and the amplitude of the current before cumulative application of the drug was normalized as 1.0. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of 6-7 experiments.



Trimebutineのこの膜電位依存性の抑制作用について更に詳細に調べる目的で、膜電位を種々のレベルに設定する条件パルス (duration, 3 sec) に続いて0 mVまで脱分極させる試験パルス (duration, 200 msec) を加えるというダブルパルス法により  $\text{Ca}^{2+}$  電流を誘発した。条件パルスの電位は -90 mVから -20 mVまで 10 mV刻みで増大させた。

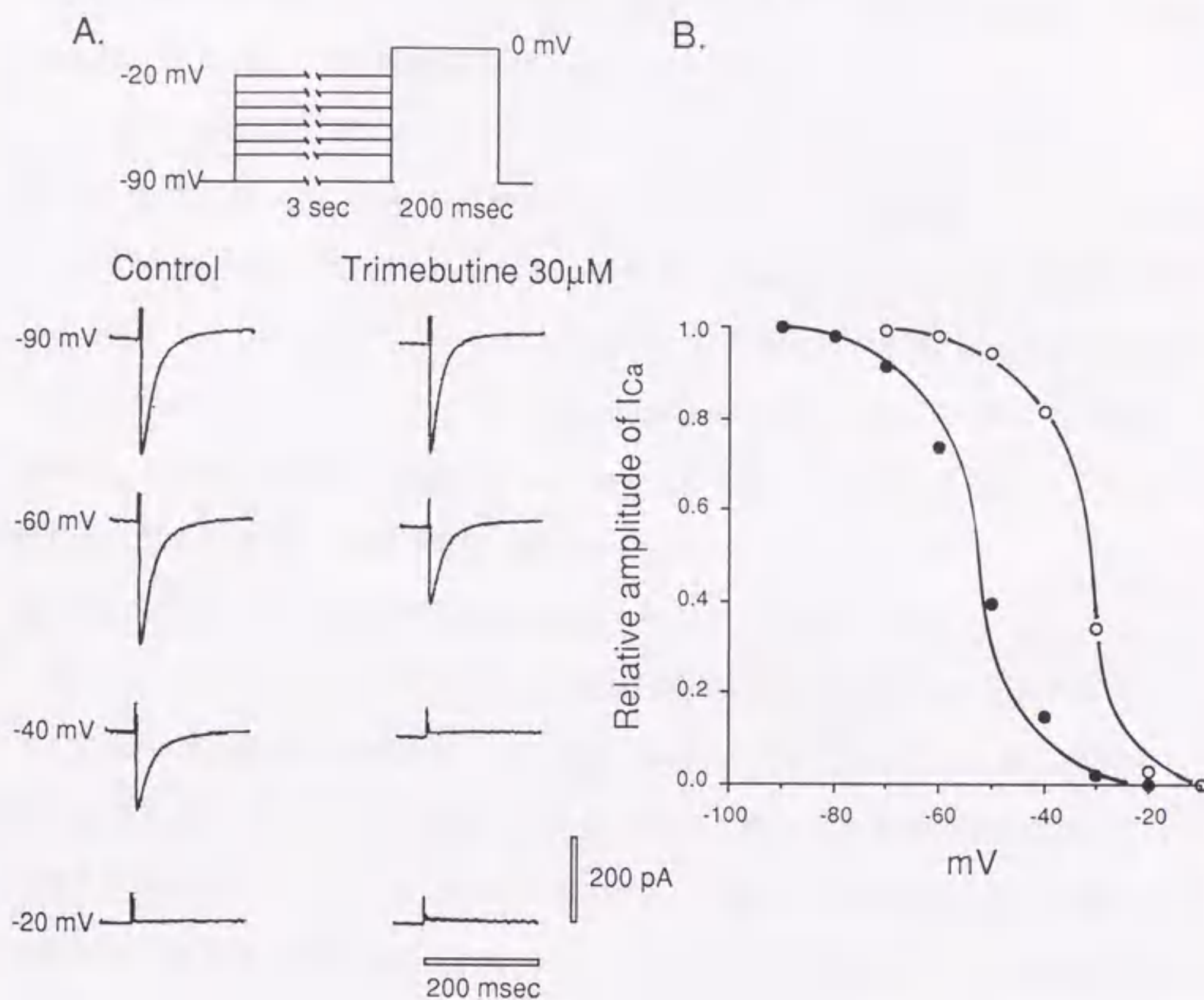


Fig.13 Effect of trimebutine on the voltage-dependent inactivation of the  $\text{Ca}^{2+}$  current. (A) Current traces recorded from a cell of which the membrane was held at different levels (-90 to -20 mV) during a 3 sec conditioning pulse and then stepped to 0 mV for 200 msec. Left row, the control; right row, in the presence of trimebutine (30  $\mu\text{M}$ ). (B) The relationships between the relative amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  current and the membrane potential attained by the conditioning pulse in the absence (○) and presence of trimebutine (30  $\mu\text{M}$ , ●). The peak amplitudes of the  $\text{Ca}^{2+}$  current evoked by stepping to 0 mV from -90 mV in the absence and presence of the drug were normalized as 1.0, respectively. Points were fitted by the Boltzmann equation (see text). The inward current was 50 % inactivated at -34 mV in the control and at -52 mV in the presence of 30  $\mu\text{M}$  trimebutine.



試験パルスにより誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の振幅は条件パルスの電位を増大するにつれて減少した。条件パルスの電位が  $-20 \text{ mV}$  のときには、試験パルスによって内向き電流は誘発されなかった (Fig.13A)。Fig.13Bは、条件パルスの電位 ( $\text{V}$ ; 横軸) に対して、試験パルスにより誘発される電流の振幅 ( $I$ ) と  $-90 \text{ mV}$  の条件パルスに続いて誘発される電流の振幅 ( $I_{\text{max}}$ ) の比 ( $I/I_{\text{max}}$ ) を図に示したものである。各点は以下に示す Boltzmann の式で描かれる曲線に適合した:

$$I/I_{\text{max}} = 1/[1 + \exp\{(V - V_{0.5})/V_s\}]$$

ここで  $V_{0.5}$  は、 $I/I_{\text{max}}$  が  $0.5$  のときの条件パルスの電位であり、 $V_s$  はスロープファクター (S字状曲線の傾斜の程度を示す係数) である。Trimebutine ( $30 \mu\text{M}$ ) 適用前の  $V_{0.5}$  は  $-33.8 \pm 1.8 \text{ mV}$ 、 $V_s$  は  $7.1 \pm 0.6 \text{ mV}$  であり、適用後はそれぞれ  $-52.0 \pm 3.2 \text{ mV}$  と  $6.5 \pm 0.5 \text{ mV}$  であった ( $n=4$ )。  $V_{0.5}$  の差は統計学的に有意であった ( $P < 0.01$ )。すなわち、S字状の不活性化曲線は trimebutine ( $30 \mu\text{M}$ ) の適用により約  $18 \text{ mV}$  だけ過分極側に移動したが、傾斜の程度は殆ど変化しなかった。この結果は、trimebutine が  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の電位依存性不活性化過程を促進することを示唆している。

次いで、trimebutine の  $\text{Ca}^{2+}$ 電流抑制作用に使用頻度依存性が認められるか否かについて verapamil の作用と比較検討した。Verapamil は、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが開口状態のときに作用しやすいようなオープンチャンネルブロッカーであり使用頻度依存的な  $\text{Ca}^{2+}$ 電流抑制作用を示すことが知られている (71)。  $-60 \text{ mV}$  の保持電位から  $0 \text{ mV}$  まで脱分極させる脱分極パルス (duration,  $100 \text{ msec}$ ) を  $30$  秒間隔で繰り返し加えることにより  $\text{Ca}^{2+}$ 電流を誘発した。脱分極パルスを加えるのを中断して、trimebutine ( $30 \mu\text{M}$ ) または verapamil ( $3 \mu\text{M}$ ) を適用した。薬物適用  $3$  分後に脱分極パルスを加えることを再開して  $\text{Ca}^{2+}$ 電流を  $5$  回誘発した後  $3$  分間だけ再び中断した。Fig.14 に示すように、trimebutine の適用  $3$  分後には  $\text{Ca}^{2+}$ 電流の振幅は約  $50\%$  に減少しており、その後に繰り返して誘発された電流における振幅の減少は僅かであった。一方、verapamil 適用  $3$  分後の最初に誘発された電流の振幅減少は僅かであったが ( $7\%$ )、繰り返して誘発されることによって次第に抑制が強くなり、 $5$  番目に誘発された  $\text{Ca}^{2+}$ 電流では振幅が約



60% になった。また、3分間の再中断後繰り返して誘発された電流でも振幅抑制が次第に強くなっていき、且つ先の一連の  $\text{Ca}^{2+}$  電流におけるよりも顕著であった (Fig. 14)。Trimebutine については他の 4 細胞で、verapamil については他の 2 細胞で上述のそれぞれの効果を確認した。これらの結果より、trimebutine の  $\text{Ca}^{2+}$  電流に対する抑制作用には、使用頻度依存性はほとんど認められず、verapamil とは異なる機序で  $\text{Ca}^{2+}$  電流を抑制すると考えられる。

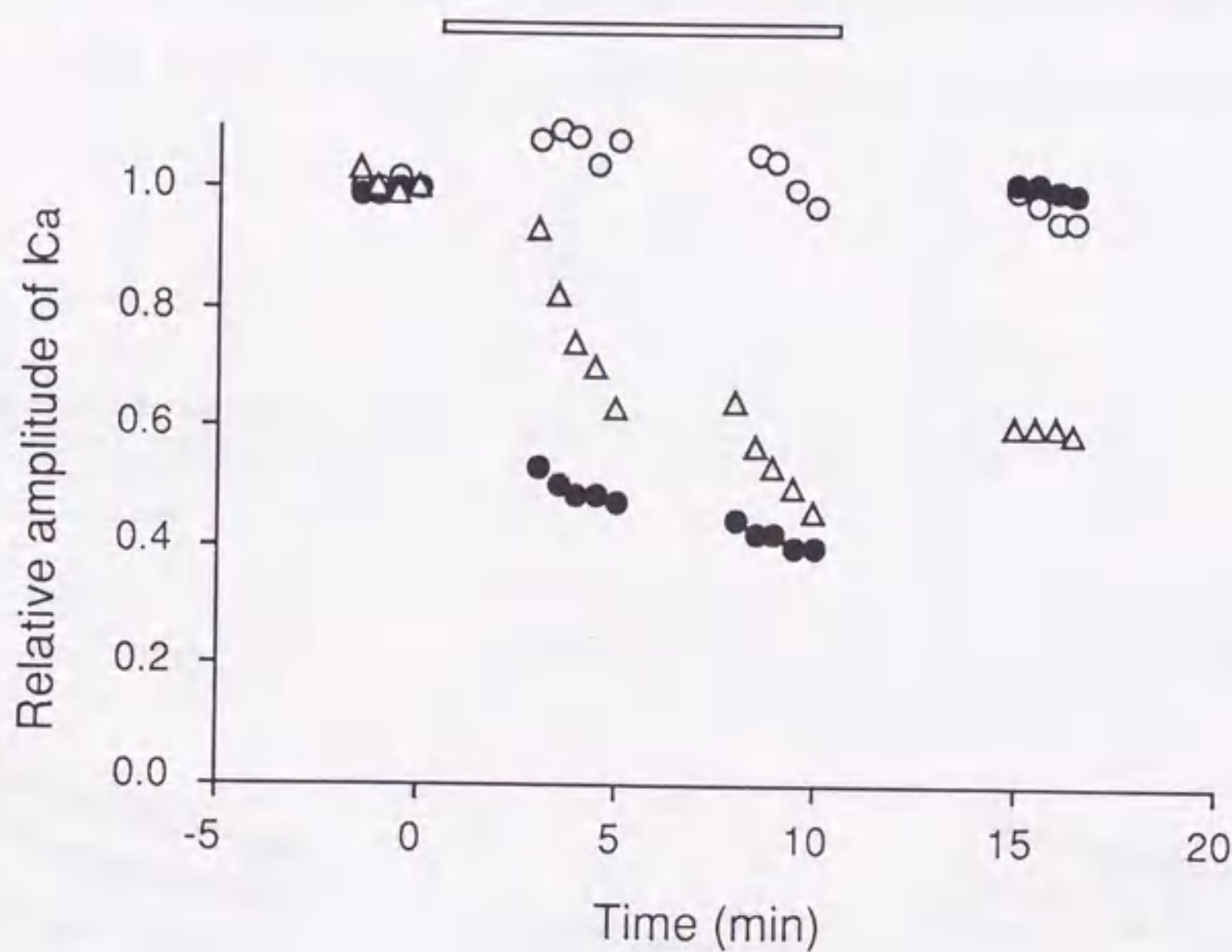


Fig.14 Comparison of the time course of the inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  current by trimebutine and verapamil. Control (○) and in the presence of trimebutine ( $30 \mu\text{M}$ , ●) and verapamil ( $3 \mu\text{M}$ , △). The drug was added at time 0 in the horizontal scale and removed at 10 min. A depolarizing pulse (100 msec in duration) to 0 mV from the holding potential of -60 mV was applied at 30 sec interval for 2 min and then the drug was added without application of the pulses. Three minutes later, a train of pulses was applied twice with a 3 min quiescent period. The amplitude of the  $\text{Ca}^{2+}$  current evoked by the pulse immediately before application of the drug was normalized as 1.0.



## 2) 電位依存性カリウム電流に対する作用

緒言で述べたように、trimebutineは $K^+$ チャンネルの抑制を介して消化管平滑筋の興奮性を高めるといふ説がある(20)。そこで、trimebutineの電位依存性 $K^+$ 電流に対する作用を調べた。細胞を正常栄養液中に浸した状態で正常ピペット液を充填したパッチピペットを用いて膜電位を $-80\text{ mV}$ に固定した。保持電位( $-80\text{ mV}$ )から脱分極パルス(duration, 5 sec)加えると、脱分極パルスの電位が $-20\text{ mV}$ 以上のときは電位依存性の外向き電流が誘発され、脱分極パルスの持続時間中に徐々に減衰した(Fig. 15)。 $0\text{ mV}$ 又はそれ以上の脱分極パルスではパルスを加えた直後に大きな一過性の電流成分がみられるようになり、この成分は $0.5$ 秒以内に消失した。Ohyaら(58)により報告されているように、種々の振幅を持った電流の律動の変動(電流のオシレーション)も外向き電流の持続性成分の上に重なって誘発された。Trimebutine(10

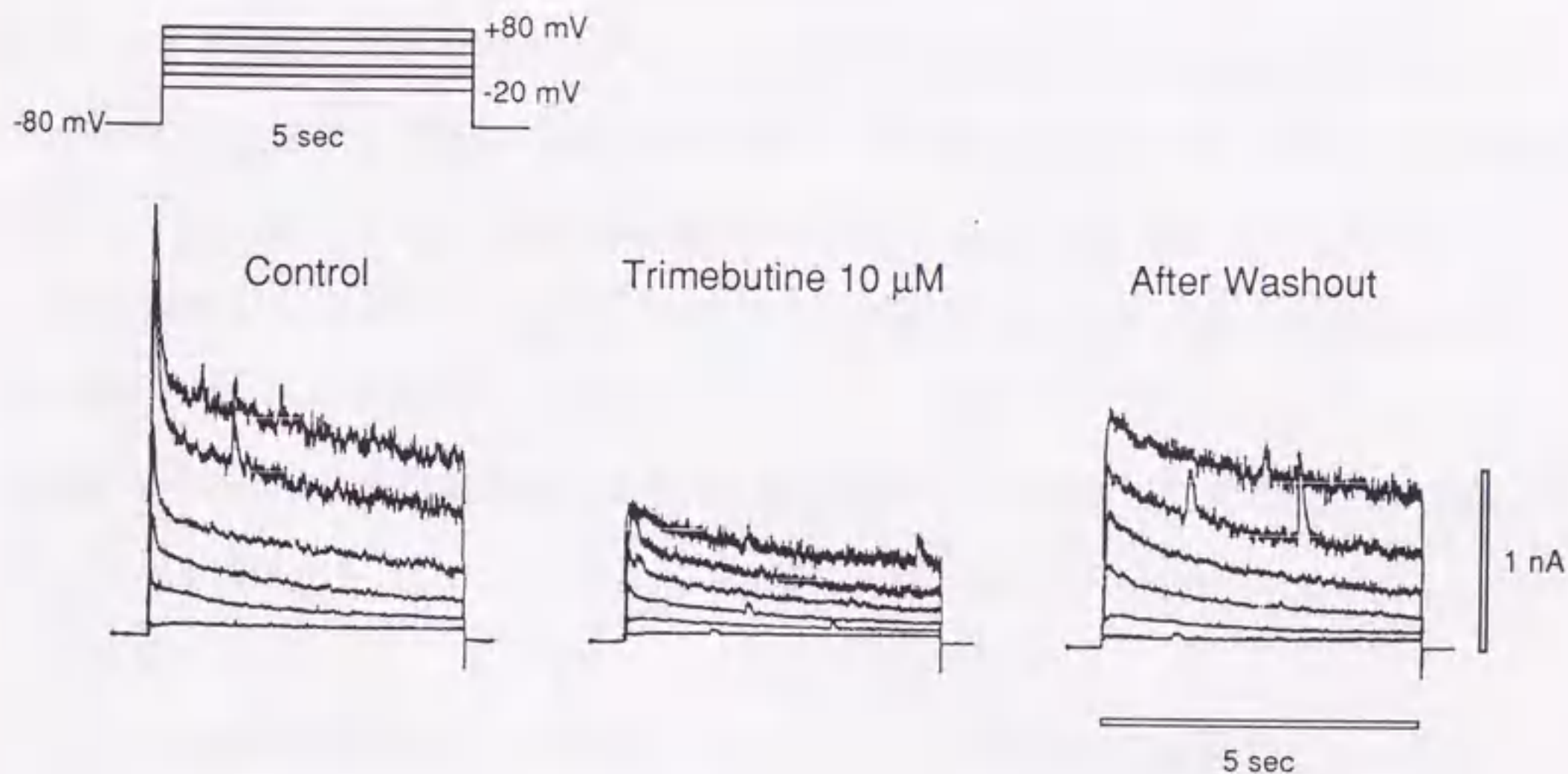


Fig.15 Effect of trimebutine on outward  $K^+$  currents elicited by stepping from  $-80\text{ mV}$  to  $-20$  to  $+80\text{ mV}$  in  $20\text{ mV}$  increments for 5 sec in a single cell bathed in normal PSS. Current traces before and after application of trimebutine ( $10\text{ }\mu\text{M}$ ) and its washout are shown in order from left to right.



$\mu\text{M}$ ) は、外向き電流の一過性及び持続性の成分を共に抑制した。持続性の成分に対する抑制効果は薬物の洗浄除去により容易に消失したが、一過性の成分に対する抑制効果は消失するまでに長時間を要した (Fig.15)。

このような外向き電流は、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の  $\text{K}^+$ チャンネルと  $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性の  $\text{K}^+$ チャンネルを通る二種の  $\text{K}^+$ 電流から成ると考えられている (57, 58)。以下の実験では、これら二つのタイプの  $\text{K}^+$ チャンネルに対する trimebutine と  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の  $\text{K}^+$ チャンネルの選択的な遮断薬である tetraethylammonium (TEA) (5) の作用を比較検討した。

$\text{Ca}^{2+}$ 非依存性の  $\text{K}^+$ チャンネルを通る  $\text{K}^+$ 電流成分 (IKV) は、栄養液の  $\text{CaCl}_2$  を  $\text{MnCl}_2$  で置換し、10 mM EGTA を含むピペット液 (方法参照) を用いることにより、全  $\text{K}^+$ 電流から  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{K}^+$ 電流成分を除去することによって得た (58, 59, 72)。IKVは、-80 mVの保持電位 から、-20 mV以上 +80 mVまで 20 mV刻みで増大する脱分極パルス (duration, 2 sec) を加えることにより誘発した。IKVの振幅は電位依存性に増大し (Fig.16B)、上述の全  $\text{K}^+$ 電流におけるような一過性の成分や電流のオシレーションはみられなかった (Fig.16A)。Trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) は IKVをその全過程を通して抑制し、この抑制効果は可逆的であった (Fig.16A)。Fig.16Bは trimebutine ( $1\sim 100 \mu\text{M}$ ) の存在下及び非存在下における脱分極パルスの電位に対する IKVの最大振幅の大きさを示したものである。Trimebutineの抑制作用には電位依存性は認められなかった (Fig.16C)。+40 mVへの脱分極パルスによって誘発される IKVの最大振幅に対する本薬の抑制作用の  $\text{IC}_{50}$ 値は、 $7.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$  ( $n=4$ ) であった (Fig.19)。TEA (1, 10 mM) の IKVに対する抑制作用も濃度依存性に増大し、電位非依存性であった (図には示していない)。TEAによる抑制の  $\text{IC}_{50}$ 値は  $4.8 \pm 0.9 \text{ mM}$  ( $n=3$ ) であった (Fig.19)。

IKVの時間依存性の不活性化過程は、必ずしも一次指数関数に適合しなかったので、時定数 ( $\tau$ ) の代わりに IKVがそのピークの 80%に減衰するのに要する時間 ( $T_{0.8}$ ) を測定し、 $T_{0.8}$ 値に対する trimebutineの作用を調べた。Trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) は  $T_{0.8}$ 値を殆ど変えなかった。すなわち、薬物適用前の  $T_{0.8}$ 値は  $0.57 \pm 0.04$  秒であり、



適用後では  $0.54 \pm 0.07$  秒であった ( $n=5$ )。Trimebutine と同様の結果が TEA でも得られた。TEA 適用前の  $\tau_{0.8}$  値は  $0.49 \pm 0.04$  秒であり、適用後の  $0.55 \pm 0.03$  秒 ( $n=4$ ) との間には有意差は認められなかった。これらの結果は、trimebutine と TEA が IKV の時間依存性不活性化過程には作用しないことを示唆する。

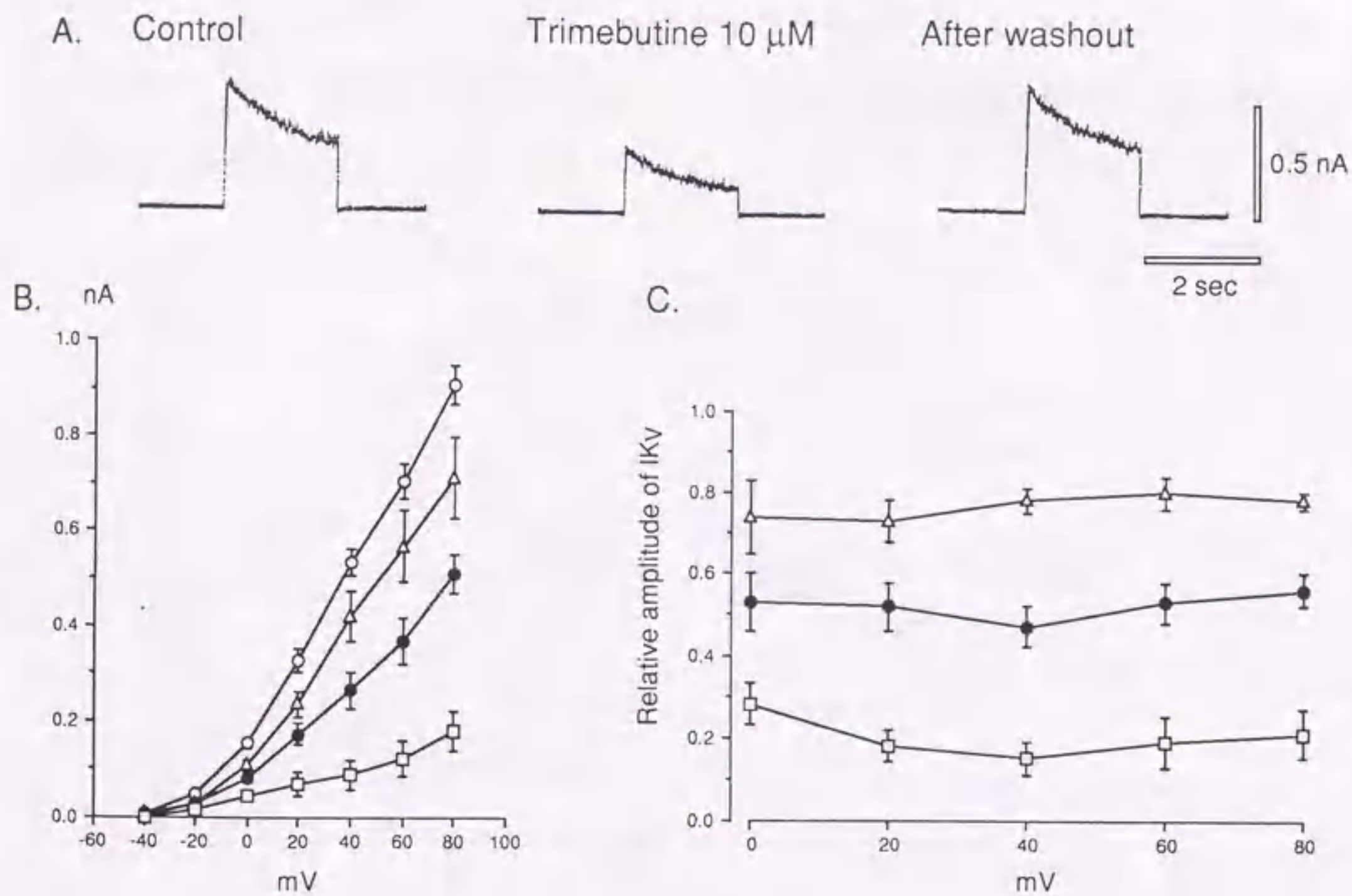


Fig.16 Effect of trimebutine on the  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $\text{K}^+$  current (IKV). The cell was bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free PSS ( $\text{Ca}^{2+}$  was replaced with  $\text{Mn}^{2+}$ ), and dialyzed intracellularly with 10 mM EGTA-containing pipette solution. (A) Traces of IKV elicited by stepping from the holding potential of -80 to +40 mV for 2 sec before (left) and after (middle) application of trimebutine (10  $\mu\text{M}$ ) and after its washout (right). (B) The current-voltage relationships (I-V curves) of IKV in the absence (○) and presence of trimebutine (1  $\mu\text{M}$ , △; 10  $\mu\text{M}$ , ●; 100  $\mu\text{M}$ , □). The peak amplitudes of IKV evoked by stepping to different potentials from the holding potential of -80 mV are plotted against the potential attained by stepping. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of four measurements in different cells. (C) Plots of the relative peak amplitude of IKV in the presence of trimebutine (1  $\mu\text{M}$ , △; 10  $\mu\text{M}$ , ●; 100  $\mu\text{M}$ , □) against the potential attained by stepping from -80 mV. The peak amplitude of IKV in the absence of trimebutine was normalized as 1.0 for each of the attained potentials. Data points were obtained from the same experiments as in (B).



TrimebutineのIKV抑制作用に使用頻度依存性が認められるか否かを検討した。細胞は膜電位を-80 mVに保持し、そこから+40 mVへ脱分極パルス (duration, 1 sec) を30秒間隔で繰り返し加えることによりIKVを誘発した。このパルス刺激を中断してtrimebutine (10  $\mu$ M) を適用し、2分間待ってからパルス刺激を再開した。Fig.17

(●) に示すように、trimebutine (10  $\mu$ M) の適用2分後にはIKVの振幅は適用前の約50%に減少しており、この抑制効果はそれ以降ほとんど変わらなかった。また、3分間パルス刺激を停止することによっても減弱されることはなかった。これと同様の結果が、他の3細胞でも観察された。このように、trimebutineのIKVに対する抑制作用には、使用頻度依存性が認められなかった。

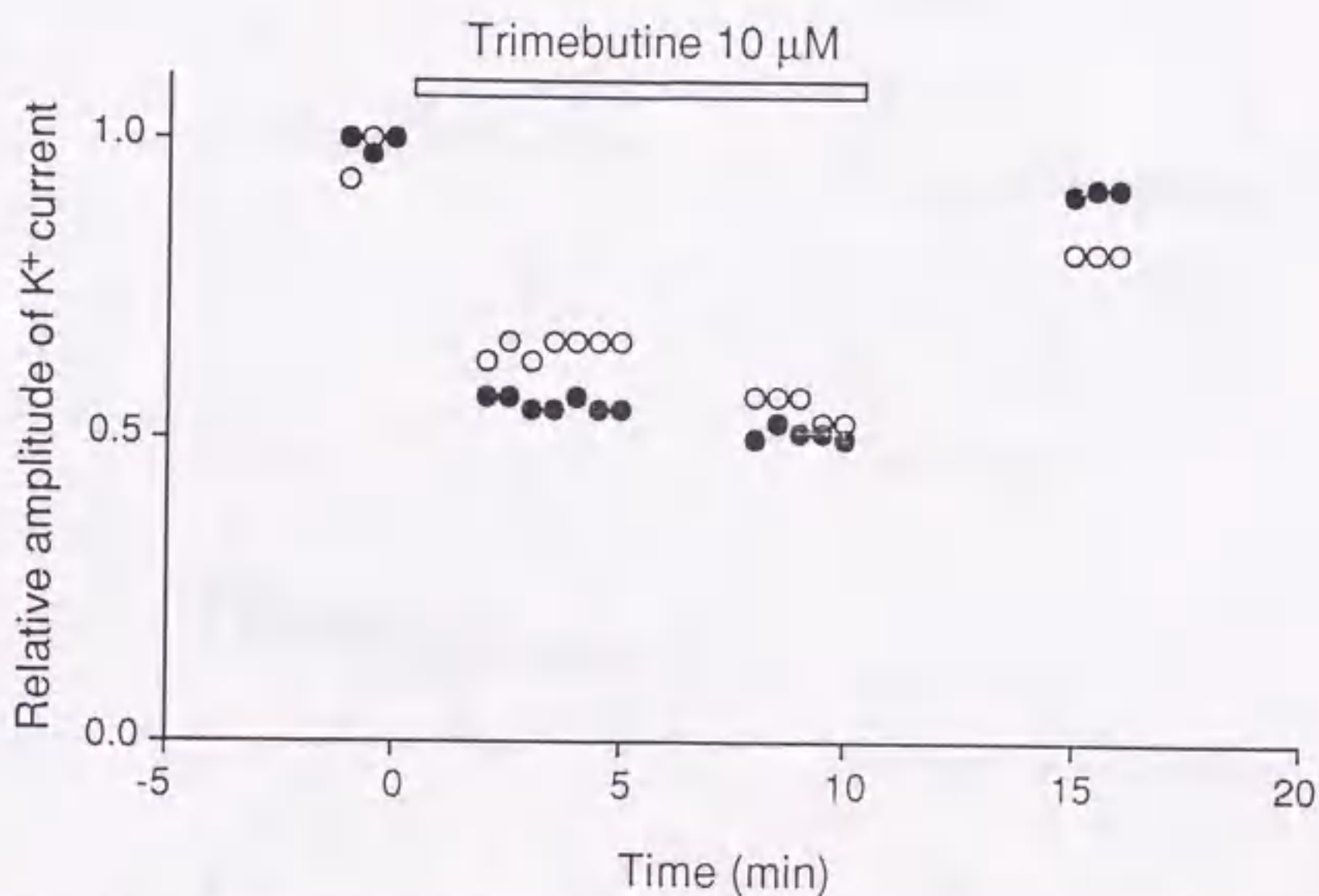


Fig.17 The time courses of the inhibition of the total K<sup>+</sup> current and Ca<sup>2+</sup>-independent K<sup>+</sup> current (IKV) by trimebutine. The cell, bathed in normal PSS and dialyzed with a 0.05 mM EGTA-containing pipette solution, was used for recording the total K<sup>+</sup> current consisting of both Ca<sup>2+</sup>-dependent and independent components (○). The cell bathed in a Ca<sup>2+</sup>-free PSS and dialyzed with a 10 mM EGTA-containing pipette solution was used for recording IKV (●). Trimebutine (10  $\mu$ M) was applied at time 0 on the horizontal scale and removed at 10 min. A depolarizing pulse (1 sec in duration) stepped to +40 mV from the holding potential of -80 mV was applied every 30 sec in the absence of the drug, the drug was applied without application of the pulse, and after a 2 min quiescent period, an identical pulse was applied again repeatedly. Five minutes after addition of the drug, application of the pulse was again withheld for 3 min. The amplitude of the total K<sup>+</sup> current or IKV recorded by the pulse immediately before application of the drug was normalized as 1.0



Ca<sup>2+</sup>依存性のK<sup>+</sup>チャンネルを通るK<sup>+</sup>電流 (IK<sub>Ca</sub>) を記録するために、細胞を浸す液として正常栄養液を用い、0.05 mM EGTA を含む液をピペット液としてを用いた。更に、0 mVで20秒間の条件パルスにより、IK<sub>V</sub>をほぼ完全に不活性化した (5, 72)。

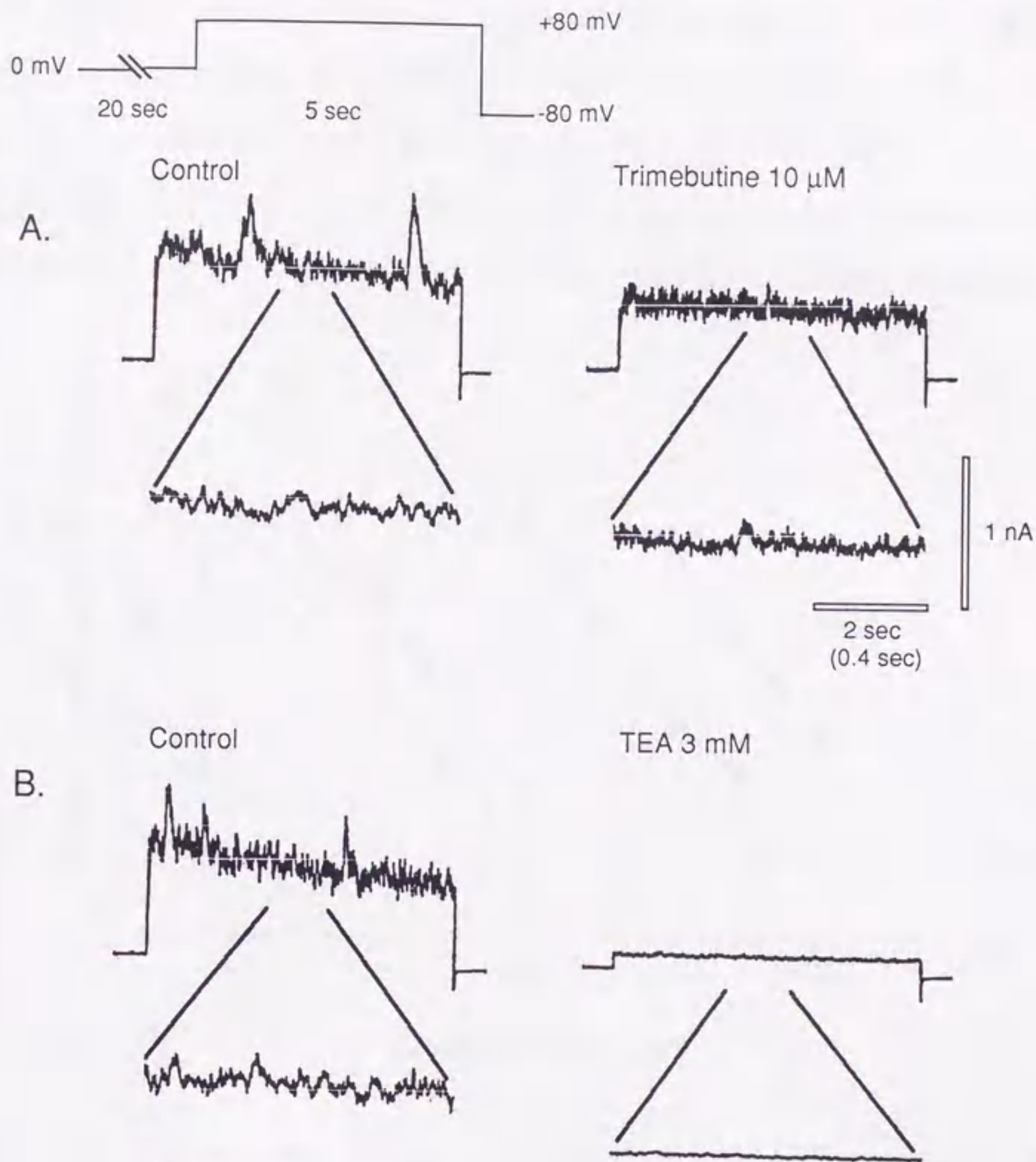


Fig.18 Effects of trimebutine and TEA on Ca<sup>2+</sup>- dependent K<sup>+</sup> current (IK<sub>Ca</sub>). (A) Current traces before and after application of trimebutine (10 μM). (B) Current traces before and after application of TEA (3 mM). A portion of each trace in A and B, as indicated by solid lines is shown on an expanded time scale. Calibration time for the fast traces is shown in the bracket. Cells were bathed in normal PSS and dialysed intracellularly with a 0.05 mM EGTA-containing pipette solution. IK<sub>Ca</sub> was elicited by stepping to +80 mV (for 5 sec) after holding at 0 mV for 20 sec.



条件パルスに続いて +80 mVまで脱分極させる試験パルス (duration, 5 sec) を加えると、大きな電流ノイズを伴う外向き電流、すなわち  $IK_C$ が誘発された (Fig.18)。  
 $IK_C$ は  $IK_V$ より減衰速度が遅かった。Trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) は、 $IK_C$ の振幅を低下し、電流ノイズの頻度を増加した (Fig.18A)。Fig.19は、trimebutine ( $1\sim 100 \mu\text{M}$ ) 及び TEA ( $0.1\sim 3 \text{mM}$ ) の  $IK_C$ と  $IK_V$ の両者に対する抑制作用の濃度作用曲線を示す。  
 Trimebutineの  $IK_C$ に対する  $IC_{50}$ 値は  $23.5 \pm 7.9 \mu\text{M}$  ( $n=5$ ) であり、上述の  $IK_V$ に対する  $IC_{50}$ 値 ( $7.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$ ;  $n=4$ ) との間に有意差が認められなかった。TEAは、 $IK_C$ の振幅と電流ノイズのどちらも濃度依存性に抑制し、 $3 \text{mM}$  TEAではほぼ完全に抑制し

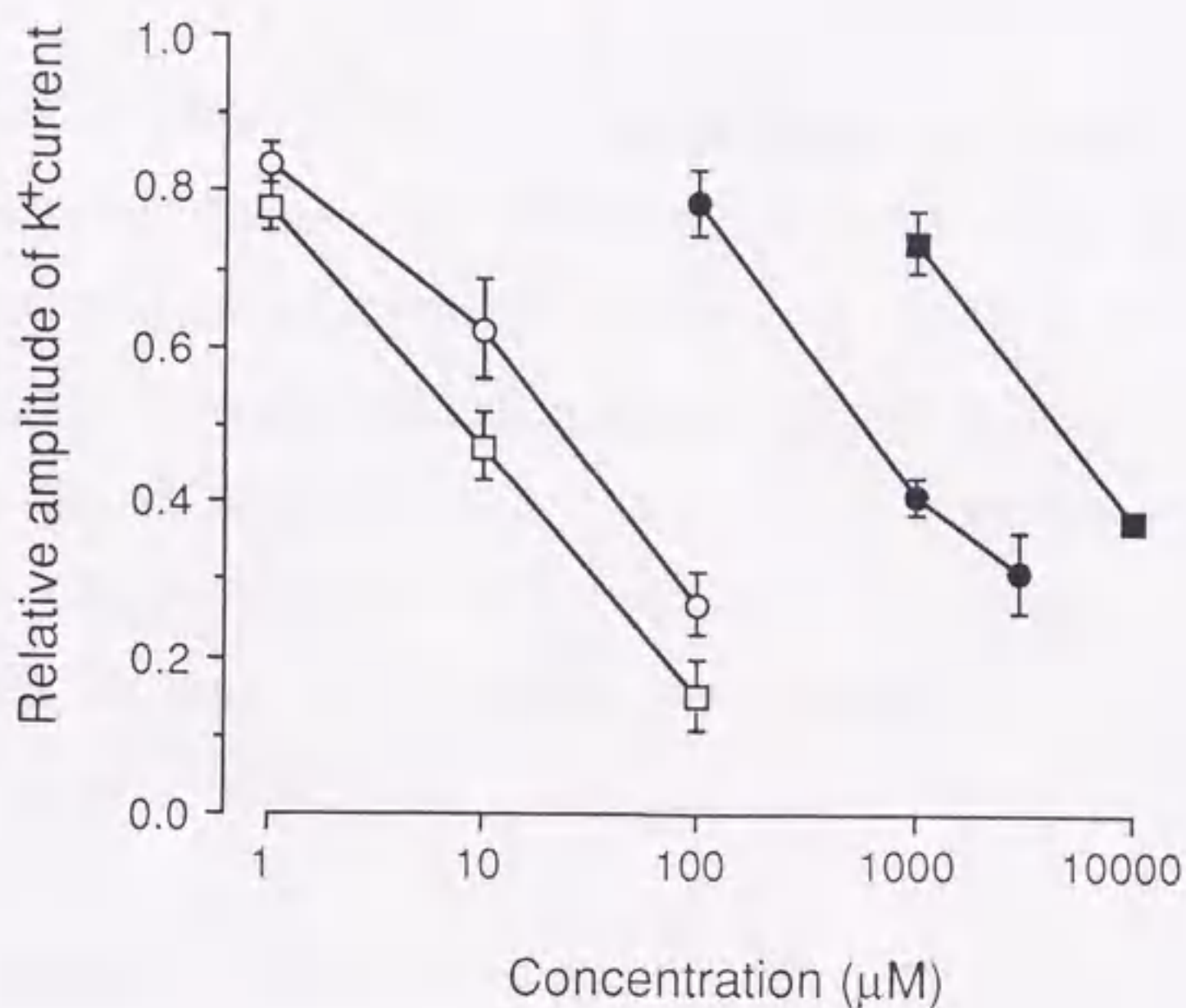


Fig.19 Effects of trimebutine ( $1\sim 100 \mu\text{M}$ ) and TEA ( $0.1\sim 10 \text{mM}$ ) on  $\text{Ca}^{2+}$ -independent  $\text{K}^+$  current ( $IK_V$ ) and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  current ( $IK_C$ ).  $IK_V$  was evoked by stepping to +40 mV from the holding potential of -80 mV in cells bathed in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free PSS and dialysed with a 10 mM EGTA-containing pipette solution.  $IK_C$  was evoked by stepping to +80 mV after holding at 0 mV for 20 sec in cells bathed in a normal PSS and dialysed with a 0.05 mM EGTA-containing pipette solution. The amplitude of  $IK_V$  or  $IK_C$  in the presence of trimebutine or TEA was expressed by taking the amplitude before its application as 1.0. The dose-response curves of trimebutine for  $IK_V$  ( $\square$ ) and  $IK_C$  ( $\circ$ ), and those of TEA for  $IK_V$  ( $\blacksquare$ ) and  $IK_C$  ( $\bullet$ ) are shown in the same graph. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of 3-5 experiments.



た (Fig.18B)。TEAの  $I_{KCa}$  に対する作用の  $IC_{50}$  値は  $0.8 \pm 0.1$  mM ( $n=5$ ) であり、 $I_{KV}$  に対する  $IC_{50}$  値 ( $4.8 \pm 0.9$  mM;  $n=3$ ) に較べて明らかに小さかった ( $P < 0.05$ )。

Trimebutineの  $I_{KCa}$  に対する抑制作用における使用頻度依存性については、 $I_{KV}$  と  $I_{KCa}$  から成る全  $K^+$  電流に対する抑制作用の使用頻度依存性を検討することによって間接的に知ろうとした。それは、 $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルの中で電位依存性のものが  $I_{KCa}$  誘発前の  $I_{KV}$  を不活性化するために加える条件パルスにより開口してしまい、使用頻度依存性を評価できなくすることが考えられるためである。Fig.17 (○) に示すように、trimebutine ( $10 \mu M$ ) の全  $K^+$  電流に対する抑制作用には使用頻度依存性が全く認められないので、本薬の  $I_{KCa}$  に対する抑制作用にも使用頻度依存性は無いと推論できる。

自発性の一過性外向き電流 (Spontaneous Transient Outward Currents; 以下 STOCs と略す) は、細胞内  $Ca$  貯蔵部から散発的に遊離される  $Ca^{2+}$  によって  $Ca^{2+}$  依存性  $K^+$  チャンネルが開口することにより発生すると考えられている (6, 11, 41, 58)。Trimebutine ( $1 \sim 100 \mu M$ ) は STOCs の振幅と放電頻度を濃度依存性に抑制した。これらの作用の  $IC_{50}$  値はそれぞれ  $12.0 \pm 5.7 \mu M$  及び  $9.8 \pm 3.5 \mu M$  ( $n=5$ ) であった。これらの作用は可逆的であった (Fig.20A と 20C)。TEA ( $0.1, 1$  mM) は STOCs の振幅を濃度依存性 ( $IC_{50}$  値,  $0.4 \pm 0.1$  ( $n=4$ )) に抑制したが、放電頻度には著明な影響を及ぼさなかった (Fig.20B と 20C)。

### 3) 膜電位及び膜抵抗に対する作用

細胞の静止膜電位と電気緊張電位に対する trimebutine の作用を電流固定法を用いて調べた。細胞は正常栄養液に浸し、 $0.05$  mM EGTA を含むピペット液を用いた。静止膜電位は  $-60$  mV から  $-20$  mV まで細胞間に変動した。静止膜電位が  $-45$  mV より浅い細胞 (脱分極側にある細胞) では、自発性の一過性過分極波が繰り返し発生した。静止膜電位が  $-43$  mV から  $-30$  mV の間にあった 4 細胞において、trimebutine ( $30 \mu M$ ) は膜電位を  $-38.0 \pm 2.8$  mV から  $-29.8 \pm 3.2$  mV に低下させた ( $n=4$ )。一方、過分極性



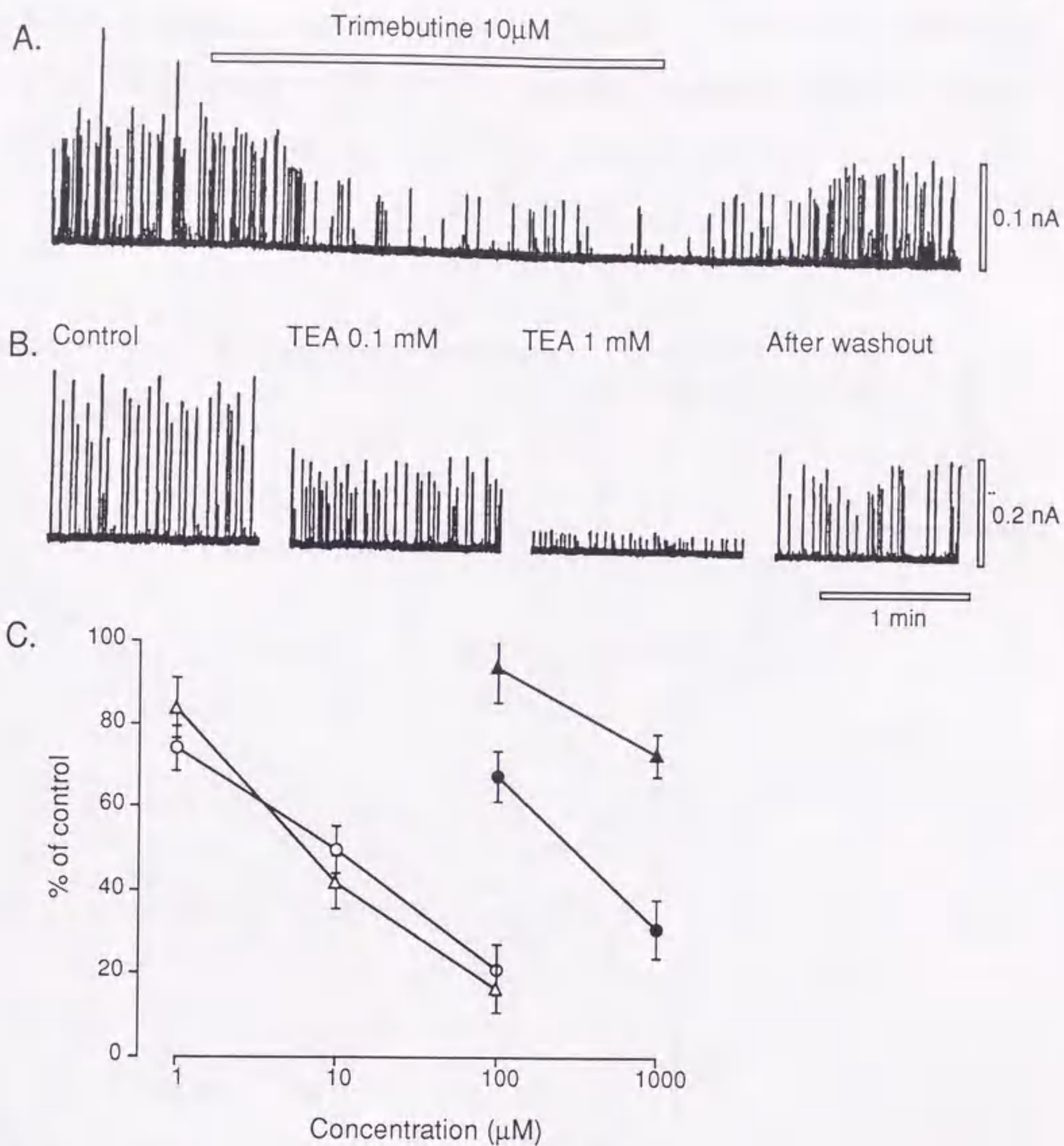


Fig.20 Effects of trimebutine and TEA on spontaneous transient  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  currents discharged at a holding potential of  $-10$  mV (A and B). Changes of spontaneous transient outward current after application of trimebutine ( $10 \mu\text{M}$ ) and TEA (cumulatively increased from  $0.1$  to  $1.0$  mM). (C) The dose-response curves for trimebutine actions to inhibit the amplitude ( $\circ$ ) and frequency ( $\Delta$ ) of spontaneous transient outward currents, and those of TEA actions to inhibit the amplitude ( $\bullet$ ) and frequency ( $\blacktriangle$ ) of spontaneous transient outward currents. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of 4-5 experiments. The mean amplitude and frequency of spontaneous transient outward currents for 30 sec before and after application of each drug were obtained, and the value before drug application were taken as 100%.



電流パルス (2~8 pA) によって誘発される電気緊張電位の振幅を増大した (Fig.21A と 21B)。膜電位を 15 mV までの範囲内で変化させる小さな電流パルスを用いて得た電流と電位変化の関係から算出した膜の入力抵抗は、trimebutine (30  $\mu$ M) の適用により  $3.9 \pm 0.3 \text{ G}\Omega$  から  $5.9 \pm 0.5 \text{ G}\Omega$  (n=3) に増加した。

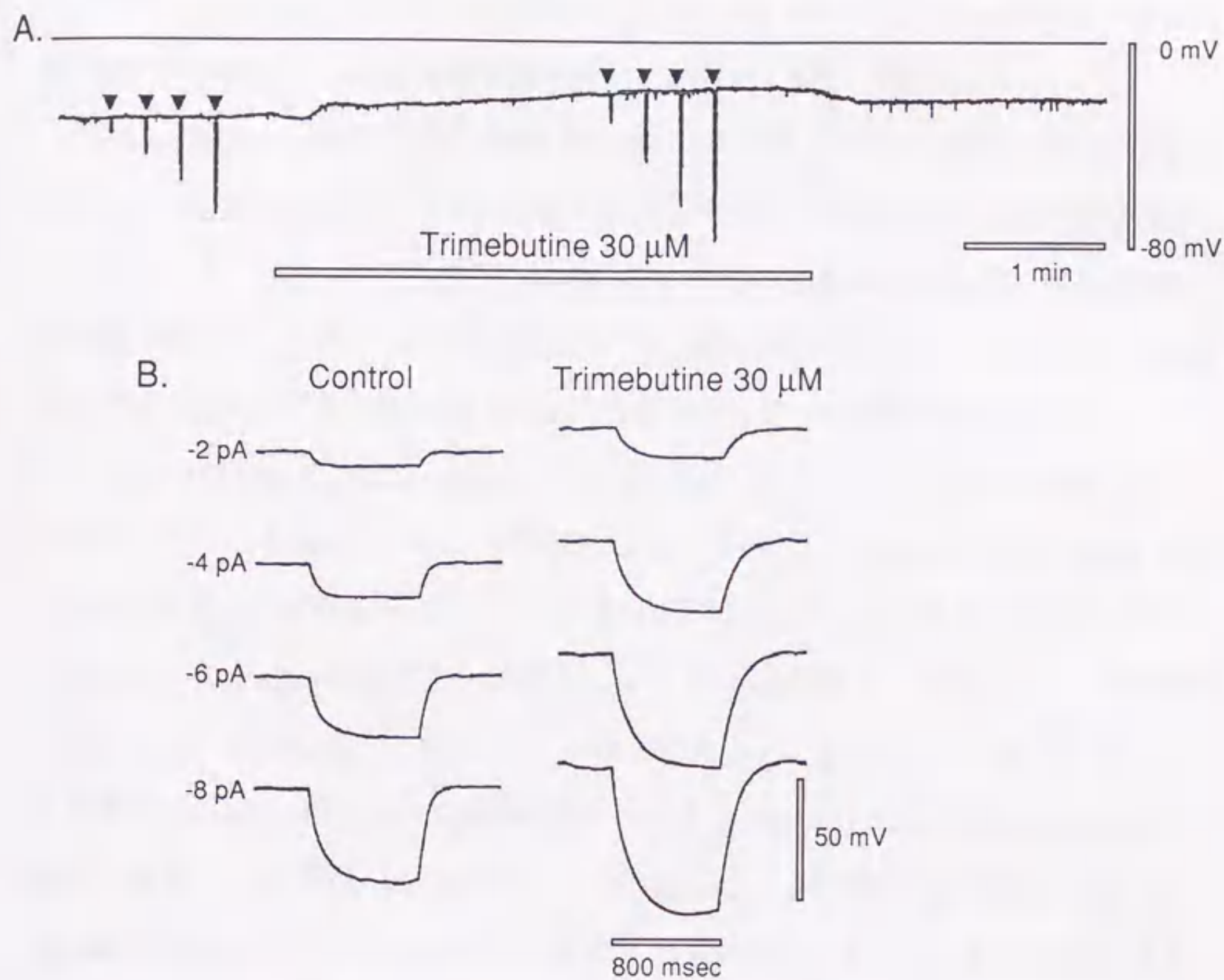


Fig.21 Effects of trimebutine (30  $\mu$ M) on the resting membrane potential and electrotonic potentials. The cell was bathed in normal PSS. (A) A membrane potential trace. Trimebutine (30  $\mu$ M) application is indicated by a thick bar below the trace. Before and during application of trimebutine, four electrotonic potentials (marked by closed triangles) were elicited by hyperpolarizing current pulses (0.8 sec in duration) of four different intensities (2, 4, 6 and 8 pA from left to right). (B) Time-expanded traces of the electrotonic potentials in A.



### 3. モルモット回腸縦走筋膜標本における [<sup>3</sup>H]nitrendipine結合に対する trimebutineの作用

これまで述べてきたように、trimebutineは平滑筋の電位依存性 Ca<sup>2+</sup>電流を抑制することにより、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇を減じて収縮力を弱めると考えられる。そこで電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対する trimebutineの作用を以下に述べるような方法で検討した。すなわち、nitrendipineなどの 1,4-dihydropyridine誘導体は L型 Ca<sup>2+</sup>チャンネルの  $\alpha_1$ サブユニットに結合することが知られている (64) ので、 [<sup>3</sup>H]nitrendipineの平滑筋細胞膜への結合に trimebutineが影響を及ぼすか否かについて検討した。

[<sup>3</sup>H]nitrendipineと回腸平滑筋膜標本との間の特異的結合は飽和性結合であり (Fig. 22A)、その Scatchardプロットが直線となり ( $r=0.93$ ) (Fig.22B)、Hill係数が  $0.95 \pm 0.01$  ( $n=4$ ) であった (Fig.22C)。従って、 [<sup>3</sup>H]nitrendipineは膜標本と単一種類の結合部で結合し、それぞれの結合部の間に相互作用が無いことが分かった。Scatchard解析により求めた平衡解離定数 (KD値) と最大結合量 (B<sub>max</sub>値) は、それぞれ  $0.16 \pm 0.01$  nMと  $1070 \pm 39$  fmol/mg protein ( $n=4$ ; Fig.22B) であった。これらの値は、同一の標本における Bolgerら (8, 9) の報告と近似していた。 Fig.22Bは trimebutine (10  $\mu$ M) の存在及び非存在下 (Control) における [<sup>3</sup>H]nitrendipine結合の Scatchardプロットを示す。Trimebutine存在下の KD値は  $0.31 \pm 0.01$  nMであり、対照値に較べて有意に大きかったが、B<sub>max</sub>値 ( $1059 \pm 22$ ) は殆ど変化していなかった ( $n=4$ )。

膜標本への [<sup>3</sup>H]nitrendipineの特異的結合に対する trimebutineと非標識 nitrendipineの阻害曲線を Fig.23に示した。両薬物とも [<sup>3</sup>H]nitrendipine結合を濃度依存性に阻害し、pseudo Hill plotにより求めたIC<sub>50</sub>値から算出した K値はそれぞれ  $9.3 \pm 1.4$   $\mu$ Mと  $0.11 \pm 0.03$  nMであり、Hill係数はそれぞれ  $1.01 \pm 0.07$ と  $0.95 \pm 0.10$ であった ( $n=3$ )。

膜標本からの [<sup>3</sup>H]nitrendipineの解離速度は、0.25 nMの [<sup>3</sup>H]nitrendipineと 25 °Cで 60分間平衡化した膜標本に超過剰濃度 (100 nM) の非標識 nitrendipineを添加することにより求めた。 Fig.24に示すように、trimebutineは [<sup>3</sup>H]nitrendipineの膜標本からの解離を促進した。Bolgerら (8) の方法により求めた trimebutine非存在下での解離速度定数



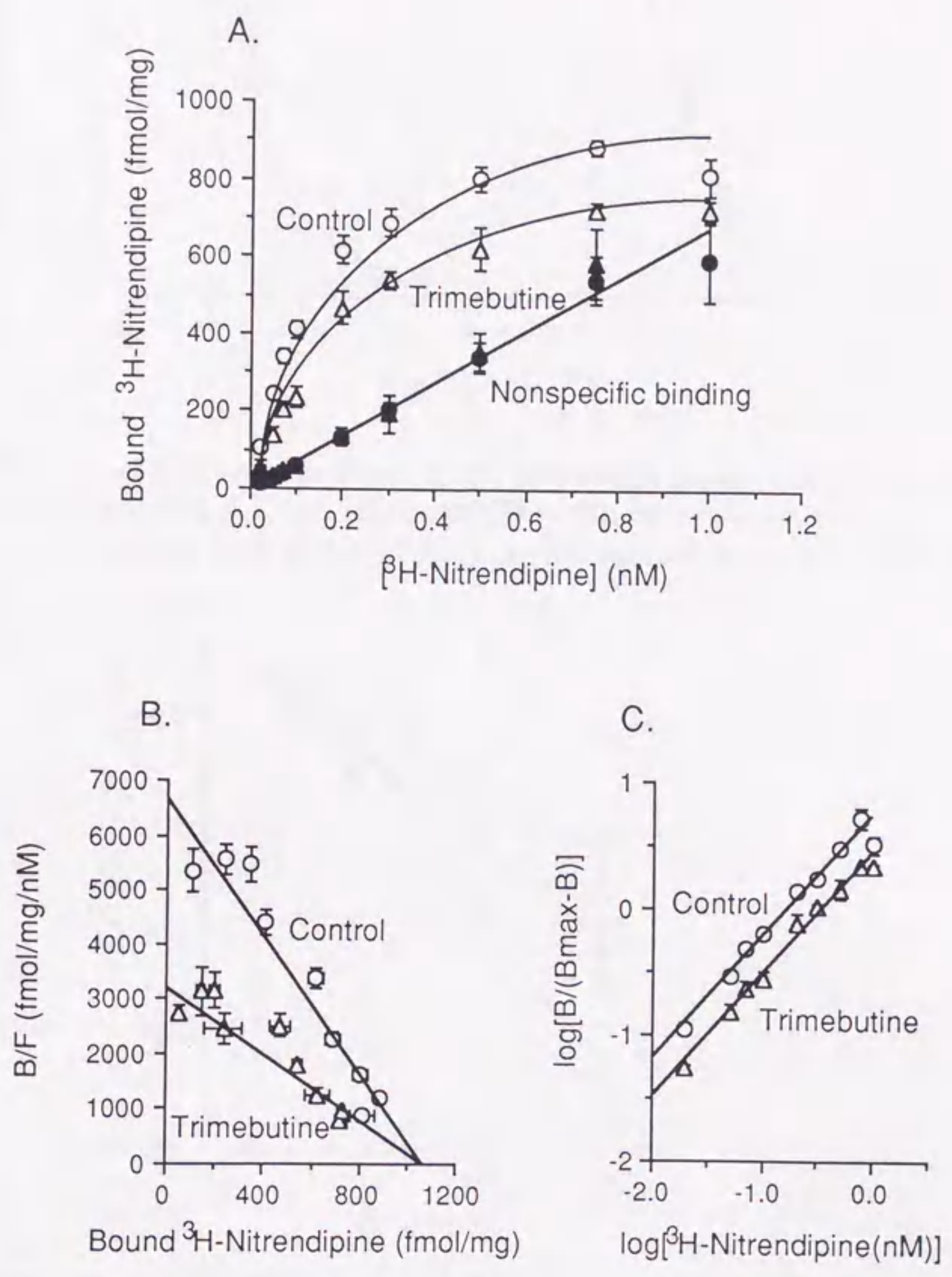


Fig.22 Saturation curves (A), Scatchard plots (B) and Hill plots (C) for the specific  $^3\text{H}$  nitrendipine binding to guinea-pig ileal smooth muscle membranes. Membranes were incubated with various concentrations of  $^3\text{H}$ nitrendipine (0.02-1.00 nM) for 60 min at 25 °C in the absence (control, ○) and presence (△) of 10  $\mu\text{M}$  trimebutine. Each value is the mean  $\pm$  S.E.M. of four experiments, each performed in duplicate.



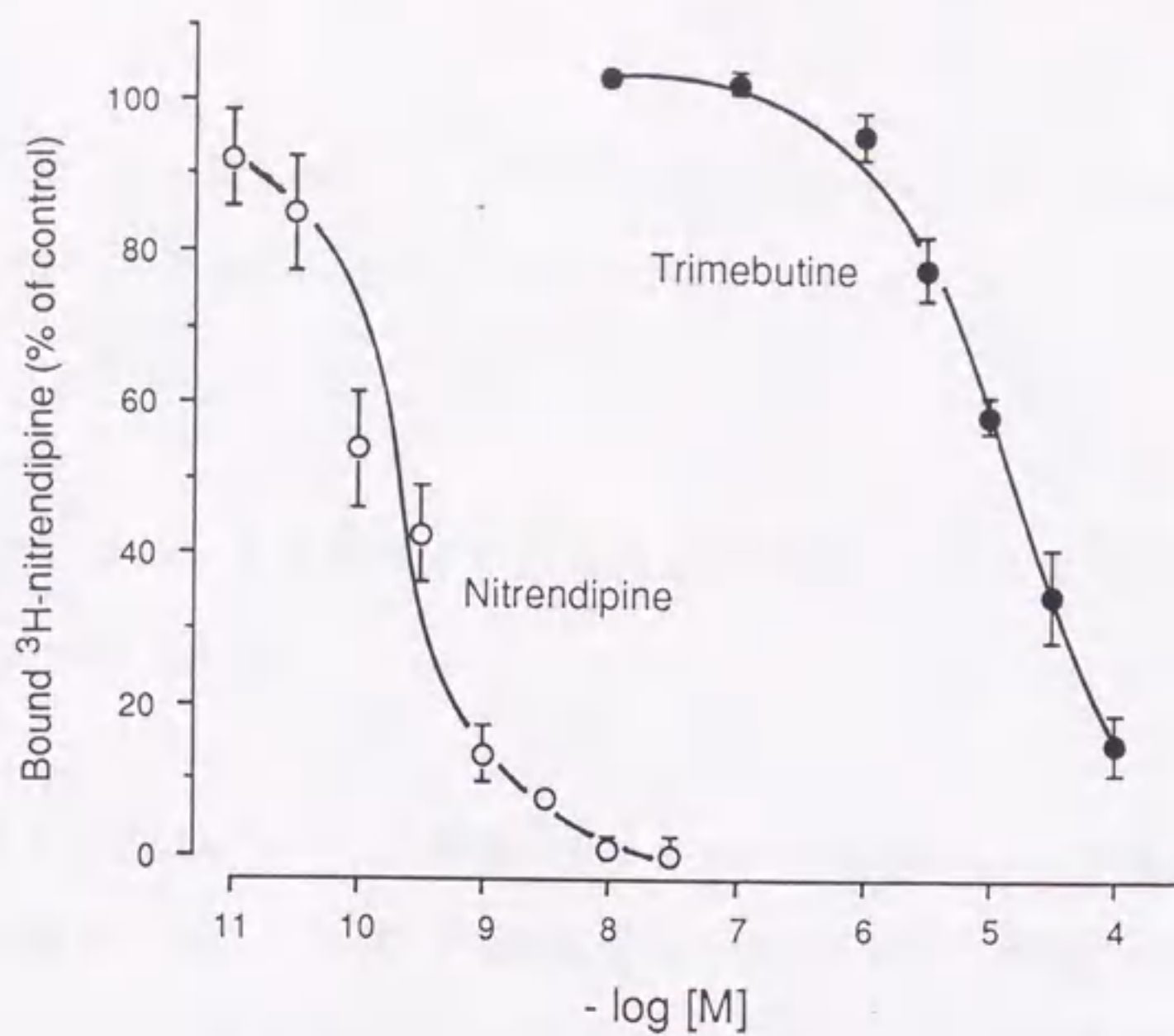


Fig.23 Inhibition of [<sup>3</sup>H]nitrendipine binding (0.1 nM) to ileal smooth muscle membranes by unlabelled (±)-nitrendipine (○) and trimebutine (●). Data are expressed as a percent of the specific binding measured in the absence of each drug, and represent the mean ± S.E.M. of three experiments.

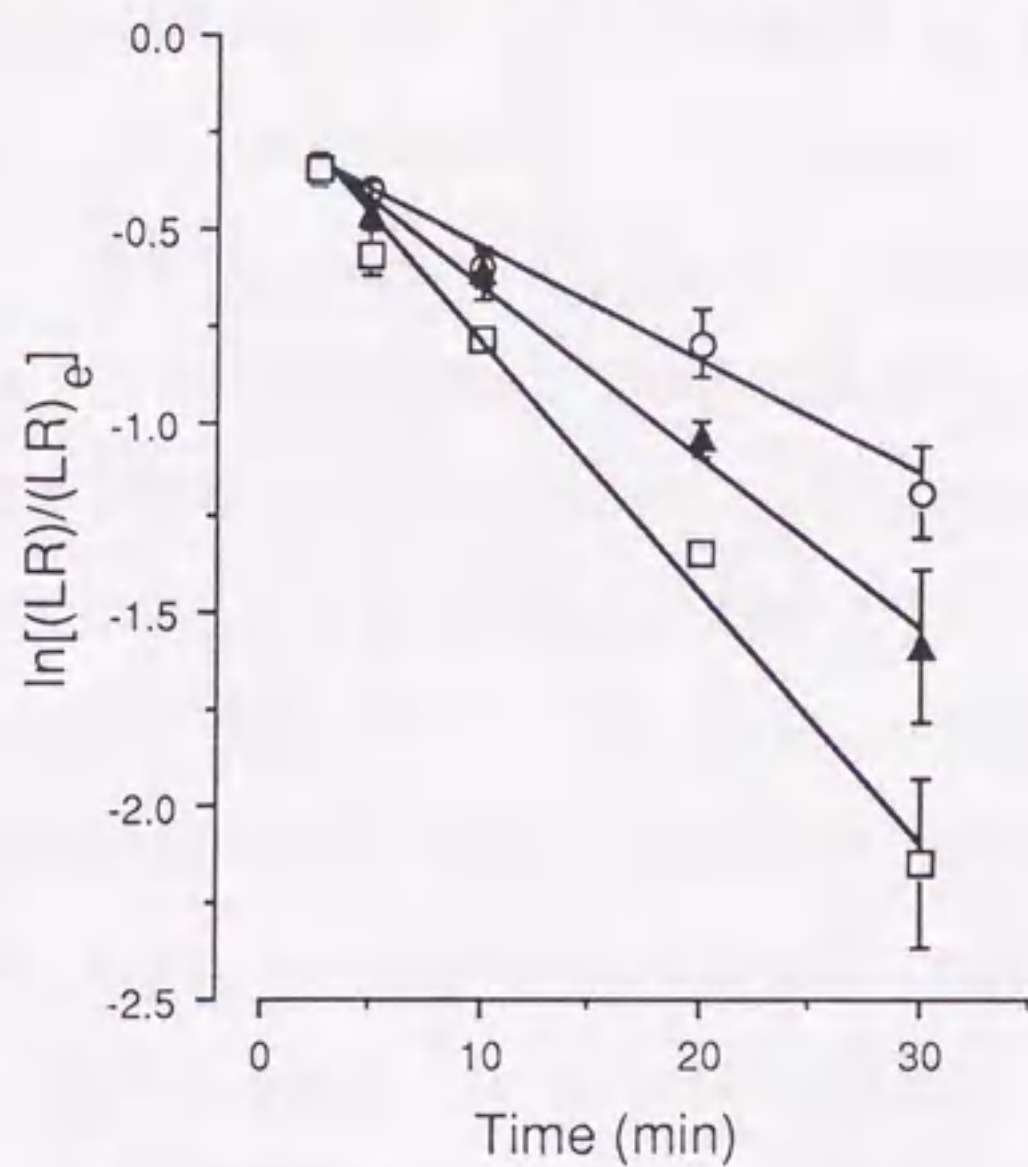


Fig.24 Time course of dissociations of specific [<sup>3</sup>H]nitrendipine binding in the absence (control, ○) and presence of 10 μM (▲) and 100 μM (□) trimebutine. The smooth muscle membranes were preincubated with 0.25 nM [<sup>3</sup>H]nitrendipine for 60 min at 25 °C. Dissociation was initiated by adding 100 nM unlabelled (±)-nitrendipine. (LR) is the concentration of [<sup>3</sup>H]nitrendipine-protein complex at time t and (LR)<sub>₀</sub> is the concentration at equilibrium before addition of cold (±)-nitrendipine. Each value is the mean ± S.E.M. of three experiments.



(k<sub>1</sub>) は  $2.9 \pm 0.4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  であり、 $10 \mu\text{M}$  と  $100 \mu\text{M}$  の trimebutine が存在すると、それぞれ  $4.5 \pm 0.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  と  $6.3 \pm 0.8 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  ( $n=3$ ,  $P<0.05$ ) に有意に増大した。

#### 4. モルモット回腸縦走筋のスキンド標本における張力変化に対する trimebutine の作用

##### 1) Carbacholによる細胞内カルシウム貯蔵部からの $\text{Ca}^{2+}$ 遊離に対する作用

脱分極筋において  $\text{Ca}^{2+}$ 除去栄養液中で carbacholにより誘発される収縮と細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇に対して trimebutineが抑制作用を示したことは、本薬が細胞内Ca貯蔵部からの  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離を抑制することを示唆している。そこで、本作用について  $\beta$ -escin処置により作製したスキンド標本を用いて更に詳細に検討した。

スキンド標本を Ca標準液 (pCa 6) に 10 分間浸漬すると、持続性の収縮が発生する (Fig. 25A) と同時に細胞内Ca貯蔵部へ  $\text{Ca}^{2+}$ が負荷された。pCa 6液を弛緩液 (G4) に置換してから 4 分後に carbachol ( $10 \mu\text{M}$ ) を 1 分間適用すると一過性の収縮が惹起した (Fig. 25A)。この一連の操作を 2 又は 3 回繰り返すと、Ca標準液浸漬中に発生する収縮の大きさは漸減したが、carbacholによる収縮の大きさは極く僅かにしか減少しなかった。すなわち、1 回目の carbachol収縮の大きさに比較して 2 回目は  $95.5 \pm 2.2\%$  ( $n=4$ ) であり、3 回目は  $90.7 \pm 7.8\%$  ( $n=3$ ) であった。Fig. 25Aは、carbacholで誘発された収縮反応に対する trimebutine ( $50 \mu\text{M}$ ) の作用を示す。Trimebutineは carbacholが誘発する収縮の振幅を抑制し、この効果は薬物を洗浄除去することにより消失した。Fig. 25Bは trimebutine ( $10, 100 \mu\text{M}$ ) の効果をまとめて示したものである。上述したように、薬物を処置しない標本における 2 回目の carbachol誘発収縮の振幅は、1 回目の  $95.5 \pm 2.2\%$  であったが、trimebutine処置下ではその濃度が  $10 \mu\text{M}$  のとき  $79.2 \pm 6.1\%$  であり、 $100 \mu\text{M}$  のときは  $61.5 \pm 1.8\%$  であった ( $n=4\sim 5$ )。後者の値は対照値に比べて有意に小さかった ( $P<0.01$ )。



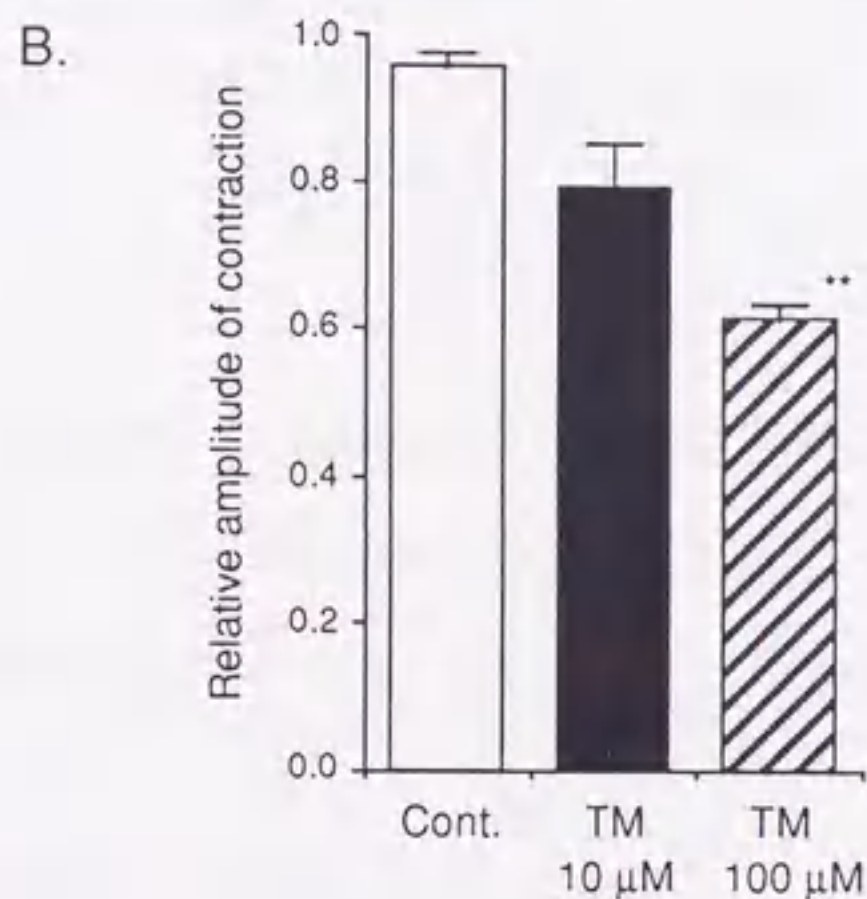
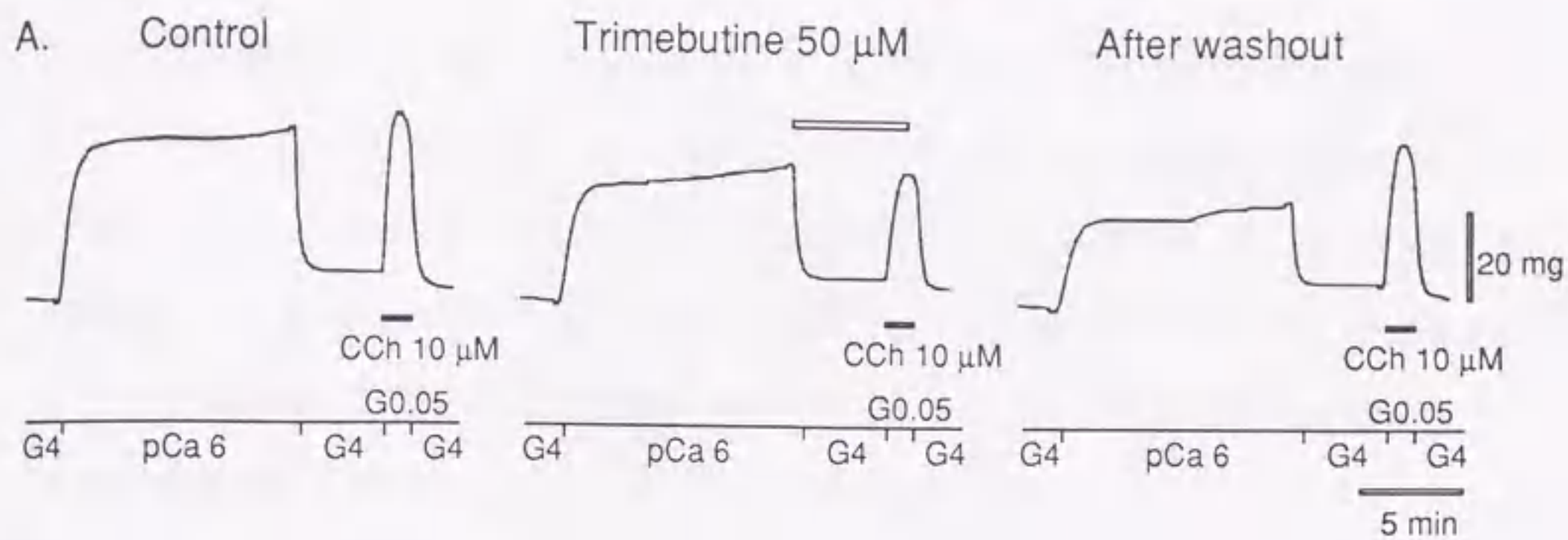


Fig.25 Effect of trimebutine on carbachol (CCh, 10  $\mu$ M)-induced contraction in skinned smooth muscle of guinea-pig ileum. After exposing the skinned muscle to a  $\text{Ca}^{2+}$  containing solution (pCa 6) for 10 min to load  $\text{Ca}^{2+}$  within stores and then to a  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution (G4, see text) for 4 min, CCh was applied in another  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution (G0.05) as indicated by bar. The protocol for exposure to the different solutions indicated in the line below (A).  $\text{Ca}^{2+}$  loading at pCa 6 and subsequent application of CCh were repeated three times (A) or twice (B). (A) Tension responses to CCh before (left) and after addition of trimebutine (50  $\mu$ M) as indicated by bar (middle) and after its washout (right) are shown. The interval of two successive panels is 5 min. (B) Summarized effects of trimebutine on the CCh response. The amplitude of the 2nd CCh responses in the absence (Cont., open column) and presence of trimebutine (10  $\mu$ M, closed column; 100  $\mu$ M, shaded column) was expressed by taking the amplitude of the respective 1st CCh responses as 1.0. Each column indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of 4-5 experiments. \*\* $P < 0.01$  v.s. Cont. (open column)



## 2) Caffeine及び inositol 1,4,5-trisphosphateによる細胞内カルシウム貯蔵部からのCa<sup>2+</sup>遊離に対する作用

平滑筋の細胞内Ca貯蔵部からCa<sup>2+</sup>が遊離する過程には、二種類の機構が作動していることが報告されている(28)。すなわち、Ca<sup>2+</sup>によるCa<sup>2+</sup>放出機構(CICR)と inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)によるCa<sup>2+</sup>放出機構(IICR)である。これらのCa<sup>2+</sup>放出機構に対するtrimebutineの作用を調べる目的で、CICR機構を促進することが知られているcaffeine(17)とIICR機構に作用するIP<sub>3</sub>(65)により誘発される収縮に対する本薬の作用を検討した。

スキンド標本へCa<sup>2+</sup>を負荷してから4分後にcaffeine(5 mM)又はIP<sub>3</sub>(25 μM)を1分間適用すると、一過性の収縮が起こった(Fig.26Aと26B)。この操作を2回繰り返しても、caffeine及びIP<sub>3</sub>により発生する収縮の大きさは殆ど変わらなかった。1回目の収縮の大きさに対する2回目の大きさはcaffeineに関しては99.3 ± 3.5%であり、IP<sub>3</sub>に関しては94.3 ± 5.3% (n=3)であった。Fig.26から明らかなように、trimebutine(100 μM)はcaffeine及びIP<sub>3</sub>により発生する収縮の大きさに対して殆ど影響を及ぼさなかった。Trimebutine処置下で2回目のcaffeineとIP<sub>3</sub>により発生する収縮の大きさはそれぞれ88.3 ± 3.4%と103.7 ± 4.5%であった(n=3)。

## 3) 収縮系のCa<sup>2+</sup>感受性に対する作用

Trimebutineは、モルモット盲腸紐平滑筋において高濃度K<sup>+</sup>を含む栄養液による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と発生張力の関係を変化させなかったことから、収縮系のCa<sup>2+</sup>感受性を変えないと考えられるが、この点をA23187処置により細胞内Ca貯蔵部の機能を無くしたスキンド標本を用いて確認した。

スキンド標本をCa標準液(pCa 6)により収縮させた後、更にtrimebutine(10, 100 μM)を適用しても、発生張力には何の変化も生じなかった(Fig.27A)。

Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) (GTPγS)は、GTP結合蛋白質(G蛋白質)を活性化して収縮系のCa<sup>2+</sup>感受性を高めることが知られている(55)。Ca標準液



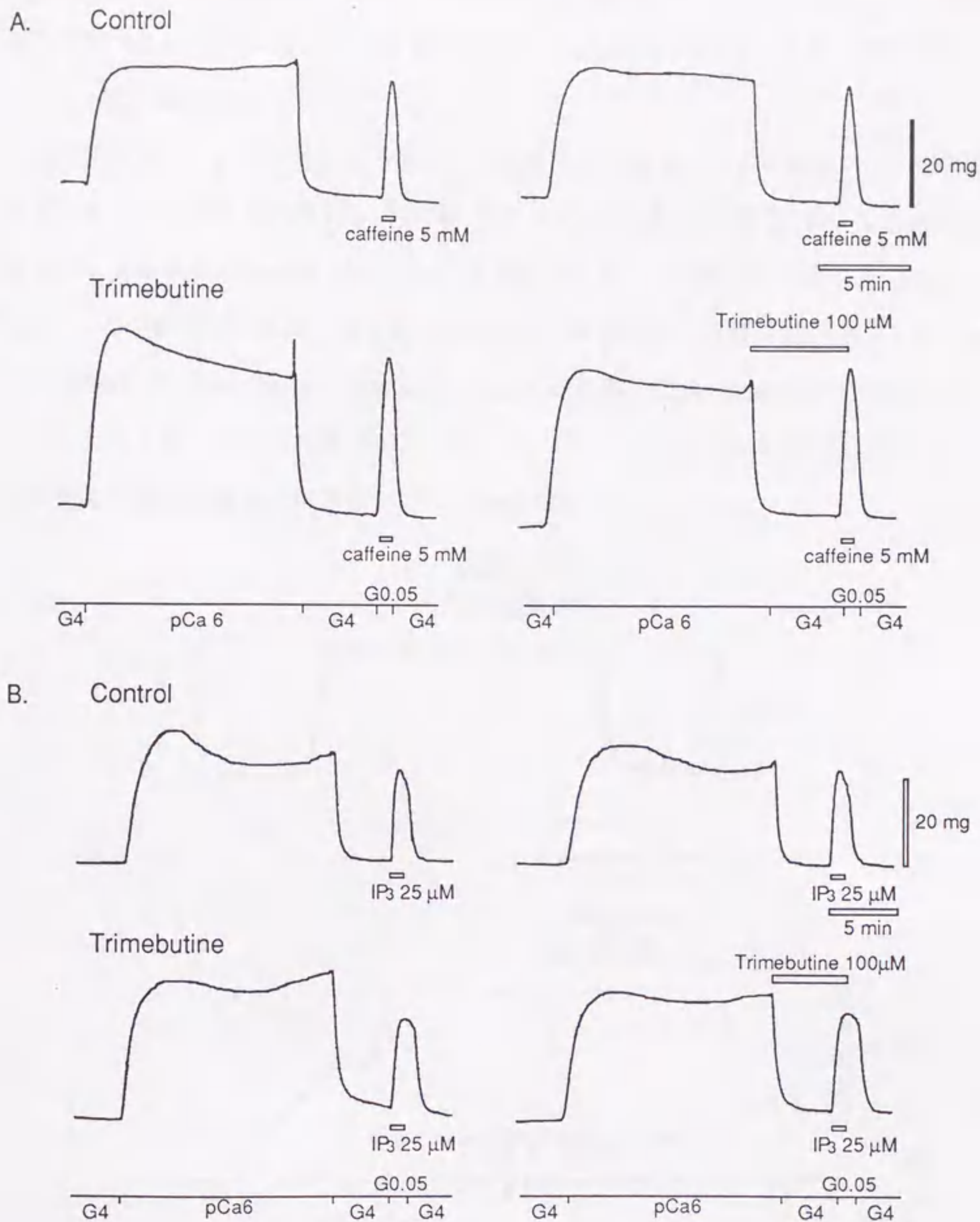


Fig.26 Effects of trimebutine (100  $\mu$ M) on caffeine (5 mM)- and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)-induced contraction in skinned smooth muscle. Ca<sup>2+</sup> loading at pCa 6 and subsequent application of caffeine (A) or IP<sub>3</sub> (B) as indicated by bar were repeated twice at a 24 min interval in three different preparations. The second application of caffeine or IP<sub>3</sub> was made in the absence (upper in A and B) and presence of trimebutine (lower in A and B) as indicated by bar.



(pCa 6.3) により収縮させたスキンド標本に  $GTP\gamma S$  ( $50 \mu M$ ) を適用すると、発生張力が増大した (Fig.27B)。更に trimebutine ( $100 \mu M$ ) を適用しても、張力は変わらなかった (Fig.27B)。

受容体作動薬も、受容体と共役したG蛋白質の活性化を介して収縮系の  $Ca^{2+}$ 感受性を高めることが報告されている (38, 40, 55)。Ca標準液 (pCa 6.3) により収縮させたスキンド標本に carbachol ( $100 \mu M$ ) を適用すると、発生張力は増大した (Fig. 28A)。この操作を2回繰り返すと carbacholによる効果は1回目の  $82.3 \pm 5.2\%$  ( $n=3$ ) に減弱した。Trimebutine ( $100 \mu M$ ) は、その適用中の carbacholに対する2回目の反応の大きさが  $83.0 \pm 2.5\%$  ( $n=3$ ) であったように、carbacholの発生張力を増大させる効果に殆ど影響を及ぼさなかった (Fig.28B)。

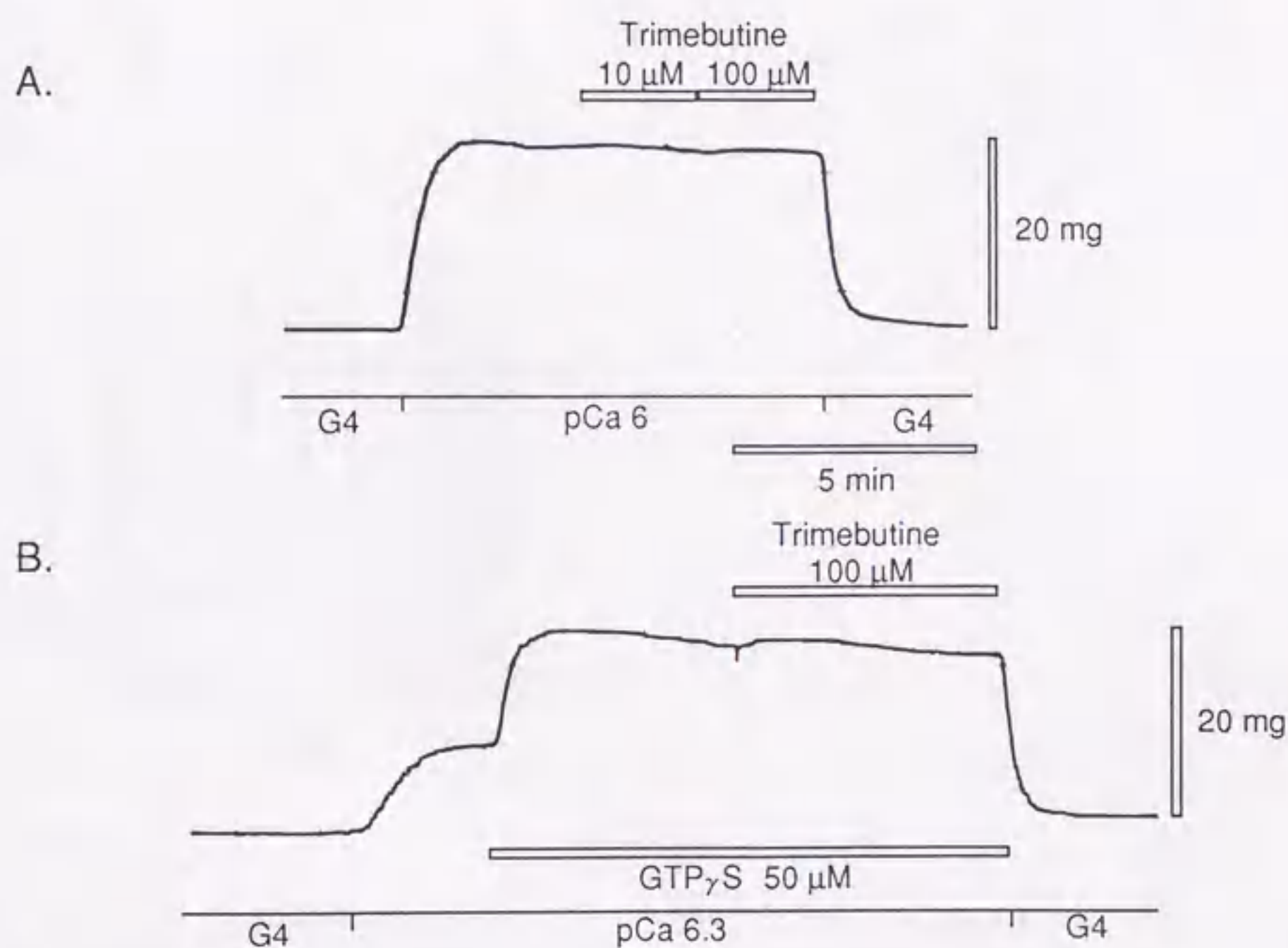


Fig.27 Effect of trimebutine on  $Ca^{2+}$  sensitivity of the contractile elements in skinned smooth muscle. The muscle preparations were pretreated with A23187 ( $10 \mu M$ ) to eliminate the  $Ca^{2+}$ -storage function. (A) No change of tension response to  $Ca^{2+}$  (pCa 6) after application of trimebutine (10 and  $100 \mu M$ ) as indicated by bar. (B) No change of enhanced tension response to  $Ca^{2+}$  (pCa 6.3) by guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) ( $GTP\gamma S$ ,  $50 \mu M$ ) after application of trimebutine ( $100 \mu M$ ) as indicated by bar.



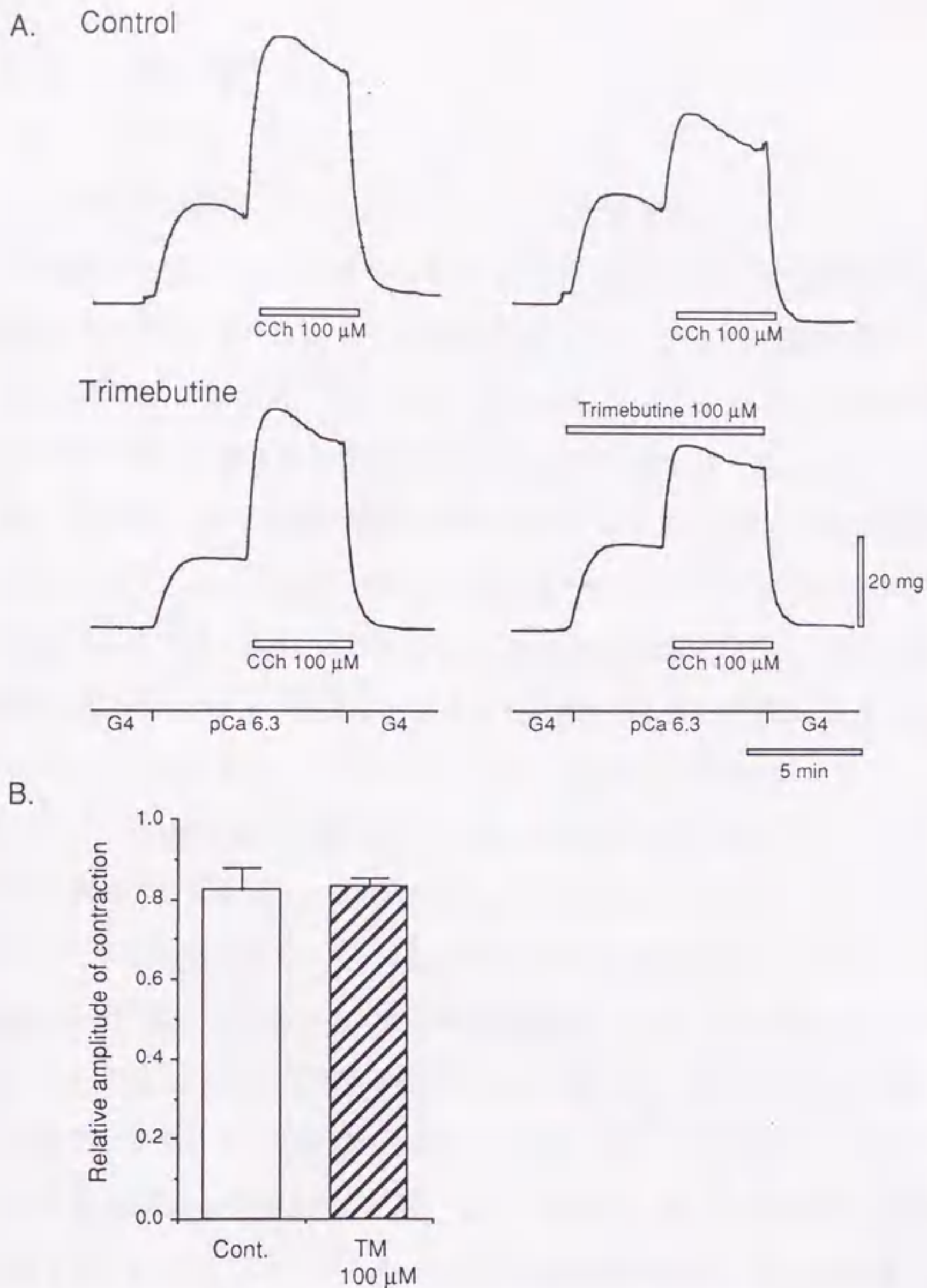


Fig.28 Effect of trimebutine (100  $\mu$ M) on enhancement of tension response to  $\text{Ca}^{2+}$  by carbachol (CCh, 100  $\mu$ M) in skinned smooth muscle. The  $\text{Ca}^{2+}$  storage function was eliminated by pretreatment with A23187 (10  $\mu$ M). (A) Enhancement by CCh of a  $\text{Ca}^{2+}$  (pCa 6.3)-induced tension repeated twice at a 20 min interval (Control; upper panels) and that repeated in the absence and presence of trimebutine as indicated by bar (Trimebutine; bottom panels). (B) Summarized effect of trimebutine on the 2nd CCh responses. The amplitude of the 2nd CCh response was expressed by taking the amplitude of the 1st CCh response as 1.0 and compared in the absence (open column) and presence of trimebutine (shaded column). Each column indicates the mean  $\pm$  S.E.M. (shown by vertical bars) of 3 experiments.



## I V 考 察

### 1. 電位依存性カルシウムチャンネルに対する作用

Trimebutineは、ウサギ回腸から単離した平滑筋細胞において膜の脱分極によって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$ 電流を濃度依存性に抑制した (Fig.12)。この抑制作用は、浅い保持電位から誘発した  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対してより強く発現した。Trimebutineは、 $\text{Ca}^{2+}$ 電流の電位依存性不活性化曲線を過分極側に平行移動させた (Fig.12と Fig.13)。このような特徴は、trimebutineが不活性化状態にある  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対する親和性がより高いことを示唆している。細胞膜の脱分極に伴って  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが不活性化されることは良く知られている。Beanら (4) 及び Sanguinetti and Kass (62) の考えに準拠して、不活性化状態の  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対する trimebutineの結合解離定数 ( $K_i$ ) は次の式により求めることができる：
$$\Delta V_{0.5} = V_s \times \ln[(1+[D]/K_i)/(1+[D]/K_r)]$$

ここで、 $\Delta V_{0.5}$ は電位依存性不活性化曲線の trimebutineによるシフトの大きさ、 $V_s$ は不活性化曲線の傾きであり、 $[D]$ は trimebutineの濃度、 $K_r$ は  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが活性化されるような閉口状態にあるときの trimebutineの解離定数である。 $\Delta V_{0.5}$ と  $V_s$ には trimebutineが  $30 \mu\text{M}$ で適用された時の  $18.2 \text{ mV}$ と  $6.5 \text{ mV}$  (Fig.13B) をそれぞれ用い、そして  $K_r$ には  $35.8 \mu\text{M}$  (保持電位が  $-60 \text{ mV}$ の時  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルは全て活性化されるような閉口状態にある (Fig.13B, Control)と仮定して、同じ保持電位における  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する trimebutineの  $\text{IC}_{50}$ 値) を用いると、 $K_i$ は  $1.0 \mu\text{M}$ と計算される。この値が  $K_r$ 値の約  $1/36$ であることから、trimebutineは不活性化状態にある  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対して、活性化されるような閉口状態にある同チャンネルよりも約  $36$ 倍親和性が高いと考えられる。しかしながら、trimebutineの  $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対する抑制効果が  $-60 \text{ mV}$ よりも  $-80 \text{ mV}$ の保持電位において弱かったことは、 $-60 \text{ mV}$ でもなお不活性化状態にある  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルが存在する可能性がある。もし、そうであれば  $K_r$ 値を実際よりも低く仮定したことになり、trimebutineは不活性化状態にある  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルに対して更に高い親和性を示すかも知れない。もう一つの可能性は、 $-80 \text{ mV}$ の保持電位では  $\text{Ca}^{2+}$ チャ



ンネルが trimebutine が結合し難い別の状態になっているということである。

Trimebutine の  $\text{Ca}^{2+}$  電流抑制作用に使用頻度依存性が認められなかったことは (Fig.14)、作用発現にチャンネルの開口を必要としないことを示唆している。一方、verapamil では既に報告されているような (71)  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対する使用頻度依存性抑制作用が確認できた。薬物のイオンチャンネル電流の使用頻度依存的な抑制作用はその pKa 値と関係のあることが報告されており、電荷を帯びた薬物は開口状態のイオンチャンネルに入り易いと考えられている (62, 71)。この説に基づくならば、trimebutine は pKa 値が 6.2 であるので、pH 7.2 の正常栄養液中では殆どイオン化していないので、 $\text{Ca}^{2+}$  電流を使用頻度依存的に抑制することはできないと推論できる。一方、verapamil の pKa 値は 8.7 であり、同じ条件下ではほぼイオン化しており、 $\text{Ca}^{2+}$  電流を使用頻度依存的に抑制すると推論できる。このように、ここに示した結果は上述の説と矛盾しない。

モルモット盲腸紐の高濃度  $\text{K}^{+}$  に対する二相性収縮反応において、一過性成分に比較して持続性の成分が trimebutine の抑制作用を受け易かった (Fig.4)。持続性成分は外液の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存しており (30)、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル拮抗薬に対する感受性が高いことから、膜の脱分極により活性化された L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを通して流入する  $\text{Ca}^{2+}$  によって引き起こされるものと考えられている (35, 36)。これらを併せ考えると、trimebutine は、主に L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルに対する抑制作用を有している可能性が高い。しかし、trimebutine が細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を低下させる過程、例えば細胞内 Ca 貯蔵部への  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを促進することにより収縮を抑制した可能性は除外できない。

Trimebutine (3~100  $\mu\text{M}$ ) はモルモット回腸平滑筋膜の  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの dihydropyridine 結合部への [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine の結合を濃度依存性に抑制し、見かけの Hill 係数はほぼ 1 であった。更に、Scatchard 解析より trimebutine は KD 値を増大したが、 $B_{\text{max}}$  値を殆ど変化させなかった (Fig.22B)。これらの特徴から、trimebutine は dihydropyridine の結合部を [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine と競合することによって抑制作用を示すものと考えられた。しかし、trimebutine は [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine の膜標本からの解離を濃度依存性



に促進したので、その抑制効果は競合拮抗作用によるものではなく、負のアロステリック相互作用によるものであることが考えられる。このようなアロステリック相互作用は、nitrendipine、verapamil、diltiazem、bepridilの様な化学構造が異なるCa拮抗薬の間で認められている(3,16)。アロステリック相互作用は、電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを構成するサブユニットの中のある一つのサブユニットに存在する別々の結合部にそれぞれの薬物が結合した場合に認められると考えられている(21,22,54)。

Teradaら(71,72)はウサギ回腸平滑筋細胞におけるCa<sup>2+</sup>電流とCa<sup>2+</sup>非依存性K<sup>+</sup>電流に対する各種Ca拮抗薬のIC<sub>50</sub>値の比較に基づいて、各薬物の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルに対する選択性を評価している。IC<sub>50</sub>値の比は、nicardipineについては190、diltiazemについては21、そしてverapamilについては11であった。Trimebutineについても同様な評価を試みると、Ca<sup>2+</sup>電流に対するCa<sup>2+</sup>非依存性K<sup>+</sup>電流のIC<sub>50</sub>値の比(7.6 μM/35.8 μM、Fig.19とFig.12参照)は0.2であり、Ca<sup>2+</sup>電流に対するCa<sup>2+</sup>依存性K<sup>+</sup>電流のIC<sub>50</sub>値の比(23.5 μM/35.8 μM、Fig.19とFig.12参照)は0.7であった。従って、trimebutineは、Ca拮抗薬という見地から言えば非特異的な有機Ca拮抗薬に分類されることになる(23)。

以上より、trimebutineは消化管平滑筋における電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャンネルのdihydropyridine結合部に対して負のアロステリック相互作用を有しており、同Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介するCa<sup>2+</sup>流入量を減少して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇の程度を低下させ、収縮を抑制することが明らかになった。

## 2. 電位依存性カリウムチャンネルに対する作用

Trimebutineはウサギ回腸から単離した平滑筋細胞において誘発した3種類のK<sup>+</sup>電流(IKV、IKCaとSTOCs)を濃度依存性に抑制した。それぞれの電流の振幅に対するIC<sub>50</sub>値は、IKVについては7.6 μM、IKCaについては23.5 μM、そしてSTOCsについては12.0 μMであった。IKVについてのIC<sub>50</sub>値とIKCaとSTOCsについてのそれぞれの値と



の間には統計学的に有意な差は無かったことから、trimebutineは  $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性及び  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の  $\text{K}^{+}$ チャンネルのどちら対しても選択的な抑制作用を示さないことは明らかである。TEAのこれらの  $\text{K}^{+}$ 電流を抑制する効力は trimebutineの 1/30以下であった。TEAは  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の  $\text{K}^{+}$ チャンネルを選択的に抑制する(5)ことから、TEAが IKVに比較して IKCaと STOCsをそれぞれ 1/6および 1/12の低濃度で抑制した本実験結果は  $\text{K}^{+}$ チャンネルには  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のものと  $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性のものがあり、IKVは  $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性の  $\text{K}^{+}$ チャンネルを流れる電流であり、IKCaは主に  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のチャンネルを流れる電流であり、そしてSTOCsは  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性の  $\text{K}^{+}$ チャンネルを流れる電流であるという説と矛盾しない(58, 59, 72)。

膜の脱分極により誘発された  $\text{K}^{+}$ 電流の中で大きな一過性の電流成分は、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルを流れて  $\text{Ca}^{2+}$ が流入する、その  $\text{Ca}^{2+}$ が Ca貯蔵部の  $\text{Ca}^{2+}$ による  $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構を作動させる、遊離された  $\text{Ca}^{2+}$ が  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性  $\text{K}^{+}$ チャンネルを活性化するという順を追って生じると考えられている(58, 61)。Trimebutineのこの  $\text{K}^{+}$ 電流成分に対する抑制作用がより持続性であったのは(Fig.15)、本薬が有している電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 電流を抑制する作用と  $\text{K}^{+}$ チャンネル抑制作用との相乗効果に起因しているかも知れない。

Trimebutineの IKVに対する抑制作用と IKVと IKCaから成る全  $\text{K}^{+}$ 電流に対する抑制作用に使用頻度依存性が認められなかったことから、本薬の IKCaに対する抑制作用にも使用頻度依存性は無いと推論できる。このように、本薬は IKVと IKCaに關与する  $\text{K}^{+}$ チャンネルが開口状態よりもむしろ閉口状態にある時に作用すると考えられる。また、trimebutineによる IKCaの電流ノイズの頻度の増加は(Fig.18A)、開口状態のチャンネルを高頻度かつ不規則にブロックすることに起因するものと思われる。このブロック作用があっても、チャンネルからの解離が速いために、本実験のプロトコールでは使用頻度依存性は認められなかった可能性がある。

ウサギ回腸縦走筋細胞において、-80 mVの保持電位から -40 mVへ脱分極させた時には全く外向き電流は誘発されなかったばかりでなく、-20 mVへ脱分極させてもごく



僅かな外向き電流しか誘発されなかったことから (Fig.15と 16B)、-30 mVから -43 mVの間の膜電位では、電位依存性の K<sup>+</sup>チャンネルの活性化は殆ど起こっていないものと考えられる。従って、trimebutineにより生じた膜抵抗の増大を伴う脱分極は

(Fig.21)、主に電位非依存性の K<sup>+</sup>チャンネルの抑制によるものと考察できる。膜電位及び膜抵抗に対する trimebutineの同様な作用は、モルモット胃の平滑筋でも観察されている (20)。ウサギ門脈の平滑筋細胞では、-60 mVから +60 mVまでの広範な電位領域で活動状態にある電位非依存性 K<sup>+</sup>チャンネルの存在が報告されており

(32)、このような K<sup>+</sup>チャンネルは静止膜電位の発生に寄与していると考えられている。仮にこの種の K<sup>+</sup>チャンネルが回腸の平滑筋細胞にも存在しており trimebutineでブロックされるとすれば、今回の実験結果は予期できることである。今泉ら (31) は、平滑筋細胞における静止膜電位の発生に寄与している可能性のある背景 K<sup>+</sup>チャンネル活動を総説している。これらの静止膜電位の発生に寄与している K<sup>+</sup>チャンネルに対する trimebutineの作用を明らかにすることは今後の研究課題である。

Trimebutineが、TEAとは異なり、STOCsの振幅ばかりでなく放電頻度も抑制したことは、Ca<sup>2+</sup>依存性の K<sup>+</sup>チャンネルに対する抑制作用に加えて電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルも抑制して、Ca<sup>2+</sup>流入量を減少して細胞質及び/或いは細胞内Ca貯蔵部の Ca<sup>2+</sup>濃度を低下させることによるものと考えられる。

一般に K<sup>+</sup>電流の抑制は消化管平滑筋の電氣的活性 (興奮性) を高めるので、trimebutineの消化管運動を亢進する効果 (20, 66, 67, 69) の少なくとも一部は、本研究で明らかになった Ca<sup>2+</sup>非依存性及び Ca<sup>2+</sup>依存性の K<sup>+</sup>チャンネルを抑制する作用より説明できると考えられる。

### 3. 細胞内カルシウム貯蔵部からの Ca<sup>2+</sup>遊離に対する作用

平滑筋において、細胞内Ca貯蔵部位から遊離される Ca<sup>2+</sup>は、細胞外から流入する Ca<sup>2+</sup>とともに収縮発現に重要な役割を演じている (10, 42)。



モルモット盲腸紐標本において、高濃度  $K^+$  を含む  $Ca^{2+}$  除去栄養液中で carbachol は細胞内貯蔵部から  $Ca^{2+}$  を遊離することによって一過性の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇と収縮を生じる (12, 57)。Trimebutine は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 によって細胞内  $Ca^{2+}$  貯蔵部から遊離される  $Ca^{2+}$  に起因する収縮を抑制した。しかし、trimebutine はスキンド平滑筋において carbachol によって生じる収縮系の  $Ca^{2+}$  に対する感受性が增大する効果を変えなかったため、その収縮抑制効果がムスカリン様アセチルコリン受容体での拮抗作用によるとは考え難い。このことは、trimebutine が [ $^3H$ ]quinuclidinyl benzilate の同受容体への結合を阻害しないこと (田中千賀子、私信) とも一致している。

更に、trimebutine にはスキンド標本における caffeine や  $IP_3$  が生じる収縮を抑制する作用も、収縮系の  $Ca^{2+}$  感受性を変える作用も、carbachol や  $GTP\gamma S$  による収縮系の  $Ca^{2+}$  感受性増大効果を変える作用もなかった。従って、trimebutine は procaine とは異なった作用機序を通して上述の carbachol が誘発する収縮を抑制するものと考えられる。

Kobayashi ら (39) は、有機  $Ca$  拮抗薬 (verapamil と nifedipine) が収縮系の  $Ca^{2+}$  感受性も  $IP_3$  による  $Ca^{2+}$  遊離も変えることなしに、受容体作動薬による細胞内  $Ca$  貯蔵部からの  $Ca^{2+}$  遊離を抑制することを観察し、それは  $Ca^{2+}$  チャンネルの dihydropyridine 結合蛋白質が受容体と連関する  $GTP$  結合蛋白質あるいは phospholipase C の機能を変える結果として生じると説明している。Trimebutine に膜標本の dihydropyridine 結合部の性質を変える作用もあったことから、本薬が dihydropyridine 結合蛋白質を介してムスカリン様アセチルコリン受容体と  $GTP$  結合蛋白質の共役から phospholipase C の活性化が起こるまでの過程か、あるいはイノシトール燐脂質代謝回転を促進する過程を阻害して carbachol によって生じる  $Ca^{2+}$  遊離を抑制したかも知れない。

生理的な条件下でも、trimebutine がそのような作用機序により細胞内  $Ca$  貯蔵部の  $Ca^{2+}$  遊離量を減少させることは考えられる。

このような trimebutine の細胞内で  $Ca^{2+}$  遊離を抑制する作用が、消化管運動に対する



本薬の抑制効果に一部分寄与しているかも知れない。

#### 4. 消化管運動に対する trimebutineの二面的な作用について

Trimebutineは、臨床薬理学的に、消化管運動が亢進している場合にはこれを抑制し、低下している場合にはこれを亢進させることが胃及び大腸において観察されている(18, 26, 46, 63)。また、摘出消化管標本においても、trimebutineは筋緊張あるいは収縮活性が高い時には自発運動抑制作用を示すが、低い時には運動亢進作用を示す(66, 67, 69)。Trimebutineの二面的な作用は tetrodotoxin、atropine、 $\alpha$  および  $\beta$  アドレナリン作動性受容体遮断薬の存在下でも認められることから(66, 67, 69)、本薬は平滑筋に直接作用して二面的な効果を発現すると考えられている。モルモット盲腸紐標本の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度と張力を同時に測定した実験において、trimebutineは両者の自発性変動を抑制し、また基底値も低下させたが(Fig.8)、反対の促進的作用を示さなかった。これは、平滑筋組織で細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度を測定するためには、予め標本に動きを可及的に少なくするように張力を負荷する必要があったので、筋緊張が高く保たれており、trimebutineの二面的な作用の中の抑制作用が優位に発現したものと推測される。消化管平滑筋における自発性収縮は膜電位の緩徐な脱分極性変化に重なって生じる  $Ca^{2+}$ スパイク(電位依存性  $Ca^{2+}$ チャンネルの活性化)が引き金となって発生するので(73)、trimebutineの自発性収縮に対する抑制作用は、主に活性化された電位依存性  $Ca^{2+}$ チャンネルを介する  $Ca^{2+}$ 流入の減少により発現したと考えられる。

Trimebutineの電位依存性  $Ca^{2+}$ チャンネル抑制作用は膜電流を測定する実験結果からも明らかである。

Trimebutineは、電位依存性  $Ca^{2+}$ 電流を膜電位依存性に抑制した。すなわち、膜電位が低い時により強い抑制作用を示した。従って膜が幾分脱分極した状態にあり、興奮性が高くなっている平滑筋細胞において本薬はより効果的に  $Ca^{2+}$ 流入を減少し、収縮を抑制することが期待される。興奮性が低い状態にある細胞は、膜電位が  $K^{+}$ の平衡電位により近いレベルに保たれている。換言すれば、細胞の静止膜電位の維持に関与



している  $K^+$ チャンネルの多くは開口状態にある。Trimebutineは、このような  $K^+$ チャンネルを抑制する可能性があることから、膜を脱分極させて興奮性を高めることが期待される。また、trimebutineは活動電位の再分極相に関与していることが知られている (5) 電位依存性  $K^+$ 電流も抑制したことから、活動電位の振幅の増大や持続時間の延長を生じる (20) などにより、興奮性作用を示すことも考えられる。このように trimebutineは、同様の濃度範囲で  $Ca^{2+}$ チャンネルと  $K^+$ チャンネルに抑制作用を示すことから、平滑筋細胞の興奮性 (両イオンチャンネルの相対的な活動状態) に依存していずれかのチャンネルに優位に作用することにより、平滑筋組織の機械的活動に関して二面的に制御するものと思われる。先にも述べたように、trimebutineの受容体刺激に続いて起こる細胞内Ca貯蔵部からの  $Ca^{2+}$ 遊離を抑制する作用も消化管運動の抑制に寄与しているかも知れない。以上のように、trimebutineの消化管運動に対する調節作用の少なくとも一部分は、本研究で明らかにされた消化管平滑筋細胞に対する直接作用によって説明できるものと考えられる。

他方、trimebutineが末梢のオピオイド受容体に作動薬として作用して (2, 34, 60)、消化管運動を変化させることが報告されている (7, 14, 19, 24, 53, 75)。Taniyamaら (70) は、モルモット回腸の壁在神経叢からの興奮性神経伝達物質である acetylcholine (ACh) と抑制性神経伝達物質である noradrenaline (NA) の遊離に対する trimebutineの作用を調べ、低濃度では  $\mu$ -オピオイド受容体を介して NA遊離を抑制し、高濃度では  $\mu$  および  $\kappa$ -オピオイド受容体を介して ACh遊離を抑制することを報告している。このように、消化管壁在神経叢からの神経伝達物質遊離に対する作用により、trimebutineの消化管運動に対する二面的な効果を説明することも可能である。

消化管運動は、平滑筋固有の機能が、壁在神経叢から遊離される神経伝達物質や消化管ホルモンなどにより制御されることによって営まれている。Trimebutineの二面的な臨床効果に、平滑筋に対する作用と壁在神経叢に対する作用の両者が相対的な力関係は不明ではあるが、寄与していることは確かである。



## V 結 論

消化管運動機能の低下時には運動亢進作用を、逆に亢進時には抑制作用を発現する trimebutine の作用機序を解明することを目的として、消化管平滑筋細胞の膜に存在する電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル及び  $\text{K}^{+}$  チャンネル、そして細胞内  $\text{Ca}$  貯蔵部からの  $\text{Ca}^{2+}$  遊離や収縮系の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性に及ぼす本薬の影響について検討し、以下の結論を得た。

1. Trimebutine は、単離した消化管平滑筋細胞において膜の脱分極によって誘発される  $\text{Ca}^{2+}$  電流を濃度依存性に抑制した。この抑制作用は、浅い保持電位から誘発した  $\text{Ca}^{2+}$  電流に対してより強く発現した。Trimebutine は、 $\text{Ca}^{2+}$  電流の電位依存性不活性化曲線を過分極側へ平行移動させた。

2. Trimebutine は、消化管平滑筋膜の  $\text{Ca}^{2+}$  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。

3. Trimebutine は、膜を脱分極させた平滑筋において  $\text{Ca}^{2+}$  によって誘発され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。

4. Trimebutine は、単離平滑筋細胞において  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性及び  $\text{Ca}^{2+}$  依存性の  $\text{K}^{+}$  電流を濃度依存性に抑制した。Trimebutine は、平滑筋細胞の膜抵抗の増大を伴う脱分極を生じた。

5. Trimebutine は、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 によって細胞内  $\text{Ca}$  貯蔵部から遊離される  $\text{Ca}^{2+}$  に起因する収縮を抑制した。しかし、スキンド平滑筋において caffeine や  $\text{IP}_3$  が生じる収縮を抑制しなかった。

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

7. 以上の結果より、trimebutine は消化管平滑筋における電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの dihydropyridine 結合部に対して負のアロステリック相互作用を有しており、同  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルを介する  $\text{Ca}^{2+}$  流入量を減少して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇の程度を低下させ、



収縮を抑制することが明らかになった。また、trimebutineの受容体刺激に続いて起る細胞内Ca貯蔵部からのCa<sup>2+</sup>遊離を抑制する作用が、消化管運動に対する本薬の抑制効果に寄与しているかも知れない。一方、trimebutineは平滑筋細胞の静止膜電位の維持に関与しているK<sup>+</sup>チャンネルや活動電位の再分極相に関与している電位依存性K<sup>+</sup>チャンネルを抑制することにより、膜を脱分極させたり活動電位の振幅の増大や持続時間の延長を生じるなどによって興奮性作用を示すことが考えられる。このようにtrimebutineは、同様の濃度範囲でCa<sup>2+</sup>チャンネルとK<sup>+</sup>チャンネルに抑制作用を示すことから、平滑筋細胞の興奮性（両イオンチャンネルの相対的な活動状態）に依存していずれかのチャンネルに優位に作用することにより、平滑筋組織の機械的活動に関して二面的に制御するものと思われる。



## 謝 辞

本論文の作製にあたり、終始御懇篤なる御指導と御高配を賜りました恩師、岐阜大学農学部教授 大橋秀法博士に厚く御礼申し上げます。また、終始御鞭撻を賜りました 岐阜大学農学部助教授 小森成一博士に深く感謝申し上げます。草稿を御校閲戴きました 帯広畜産大学畜産学部教授 西村昌数博士、岩手大学農学部教授 小林晴男博士、東京農工大学農学部教授 笹本修司博士、岐阜大学大学院連合獣医学研究科教授 武脇義博士に謹んで感謝の意を表します。

本研究の機会を与えられ、また多大の御便宜と御配慮を賜りました 田辺製薬株式会社代表取締役社長 千畑一郎博士、研究開発総括 土佐哲也博士、薬理研究所所長 岩崎為雄博士に厚く御礼申し上げます。

本研究実施中、常に適切な御指導と御鞭撻を賜りました 薬理研究所元副所長 玉木元博士に深く感謝致しますとともに、本論文の作製にあたり多大なる御助言を戴きました 研究開発企画センター 石塚徹博士ならびに 薬理研究所 内藤一秋博士に厚く御礼申し上げます。また、実験ならびに本論文作製に際して御協力を戴きました 岐阜大学農学部獣医学科薬理学教室各位ならびに 薬理研究所各位に感謝致します。



## 引用文献

- 1) 阿部井徹、磯貝庄、大貫寿衛、岡田正、長田信、川村顕、桐生恭好、小泉宏、鈴木紘一、高木敏、高橋日和、土屋雅春、中村克彦、難波経彦、村岡松生、横井幸雄、横田嘩 (1977). 各種消化器愁訴に対する TM-906の効果 (Metoclopramideとの多施設二重盲検比較試験). 臨床評価 5, 189-203.
- 2) Allescher, H.D., Ahmad, S., Classen, M. and Daniel, E.E. (1991). Interaction of trimebutine and Jo-1196 (fedotozine) with opioid receptors in the canine ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257, 836-842.
- 3) Balwierczak, J.L., Johnson, C.L. and Schwartz, A. (1987). The relationship between the binding site of [<sup>3</sup>H]-d-cis-diltiazem and that of other non-dihydropyridine calcium entry blockers in cardiac sarcolemma. *Mol. Pharmacol.* 31, 175-179.
- 4) Bean, B.P., Cohen, C.J. and Tsien, R.W. (1983). Lidocaine block of cardiac sodium channels. *J. Gen. Physiol.* 81, 613-642.
- 5) Beech, D.J. and Bolton, T.B. (1989). Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J. Physiol.* 418, 293-309.
- 6) Benham, C.D. and Bolton, T.B. (1986). Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J. Physiol.* 381, 385-406.
- 7) Blanquet, F., Bouvier, M. and Gonella, J. (1985). Action of trimebutine in cat and rabbit colon: Evidence of an opioid-like effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234, 708-712.
- 8) Bolger, G.T., Gengo, P., Klockowski, R., Luchowski, E., Siegel, H., Janis, R.A., Trigg, A.M. and Trigg, D.J. (1983). Characterization of binding of the Ca<sup>++</sup> channel antagonist, [<sup>3</sup>H]nitrendipine, to guinea-pig ileal smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225, 291-309.
- 9) Bolger, G.T., Gengo, P.T., Luchowski, E.M., Siegel, H., Trigg, D.J. and Janis, R.A.



- (1982). High affinity binding of calcium channel antagonist to smooth and cardiac muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 1604-1609.
- 10) Bolton, T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59, 606-718.
- 11) Bolton, T.B., and Lim, S.P. (1989). Properties of calcium stores and transient outward currents in single smooth muscle cells of rabbit intestine. *J. Physiol.* 409, 385-401.
- 12) Brading, A.F. and Sneddon, P. (1980). Evidence for multiple sources of calcium for activation of the contractile mechanism of guinea-pig taenia coli on stimulation with carbachol. *Br. J. Pharmacol.* 70, 229-240.
- 13) Cheng, Y. and Prusoff, W.H. (1973). Relationship between the inhibition constant ( $K_i$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition ( $IC_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* 22, 3099-3108.
- 14) Daniel, E.E., Kostolanska, F., Allescher, H.D., Ahmad, S. and Fox, J.E.T. (1988). Local actions of trimebutine maleate in canine small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245, 1002-1009.
- 15) De Lean, A., Munson, P.J. and Rodbard, D. (1978). Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: Application to bioassay, radio-ligand assay and physiological dose response curves. *Am. J. Physiol.* 253, E97-102.
- 16) Ehlert, F.J., Roeske, W.R., Itoga, E. and Yamamura, H.I. (1982). The binding of [ $^3H$ ] nitrendipine to receptors for calcium channel antagonists in the heart, cerebral cortex, and ileum of rats. *Life Sci.* 30, 2191-2202.
- 17) Endo, M., Kitazawa, T., Yagi, S., Iino, M. and Kakuta, Y. (1977). Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers, in: *Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle* edited by Casteels, R., Godfraind, T. and Ruegg, J.C. (Elsevier Science Publishers, Amsterdam) p.199-209.
- 18) 福土審、鈴木仁一、田中義規. (1986). 過敏性腸症候群に対する Trimebutine



- maleateの臨床比較試験ならびに大腸運動への影響. 薬理と治療 9, 5841-5854.
- 19) Fioramonti, J., Fargeas, M.J. and Bueno, L. (1984). The involvement of opiate receptors in the effects of trimebutine on intestinal motility in the conscious dog. *J. Pharm. Pharmacol.* 36, 618-621.
  - 20) Furukawa, K. and Kimoto, K. (1984). Effects of trimebutine maleate (TM-906) on electrical and mechanical activities of smooth muscles of the guinea-pig stomach. *Jpn. J. Pharmacol.* 35, 307-317.
  - 21) Galizzi, J.P., Borsotto, M., Barhanin, J., Fosset, M. and Lazdunski, M. (1986). Characterization and photoaffinity labeling of receptor sites for the  $Ca^{2+}$  channel inhibitors d-cis-diltiazem, ( $\pm$ )-bepridil, desmethoxyverapamil, and (+)-PN 200-110 in skeletal muscle transverse tubule membranes. *J. Biol. Chem.* 261, 1393-1397.
  - 22) Glossmann, H., Ferry, D.R., Goll, A., Striessnig, J. and Zernig, G. (1985). Calcium channels and calcium channel drugs: recent biochemical and biophysical findings. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 35, 1917-1935.
  - 23) Godfraind, T., Miller, R. and Wibo, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38, 321-416.
  - 24) Gue, M., Pascaud, X., Honde, C., Junien, J.L. and Bueno, L. (1988). Peripheral antagonistic action of trimebutine and  $\kappa$  opioid substances on acoustic stress-induced gastric motor inhibition in dogs. *European J. Pharmacol.* 146, 57-63.
  - 25) Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
  - 26) 原沢茂、三輪剛 (1985). 慢性腎炎における上腹部不定愁訴と胃排出能との関連についての検討 -Trimebutine maleateの効果-. *臨床と研究* 62, 115-119.
  - 27) Himpense, B. and Somlyo, A.P. (1988). Free-calcium and force transients during depolarization and pharmacomechanical coupling in guinea-pig smooth muscle. *J. Physiol.*



395, 507-530.

- 28) Iino, M. (1987). Calcium dependent inositol trisphosphate-induced calcium release in the guinea-pig taenia caeci. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142, 47-52.
- 29) 飯野正光、遠藤真 (1987). イノシトール三燐酸によるカルシウム放出に対する薬物効果. *日薬理誌* 90, 8P.
- 30) Imai, S. and Takeda, K. (1967). Actions of calcium and certain multivalent cations on potassium contracture of guinea pig's taenia coli. *J. Physiol.* 190, 155-169.
- 31) 今泉祐治、村木克彦、辺見智、渡辺稔 (1993). 単離平滑筋細胞の  $K^+$  及び  $Cl^-$  チャンネルの生理的役割と調節. *日薬理誌* 101, 153-167.
- 32) Inoue, R., Okabe, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1986). A newly identified  $Ca^{2+}$  dependent  $K^+$  channel in the smooth muscle membrane of single cells dispersed from the rabbit portal vein. *Pflugers Arch.* 406, 138-143.
- 33) Itoh, T., Kuriyama, H. and Suzuki, H. (1981). Excitation-contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery. *J. Physiol.* 321, 513-535.
- 34) Kaneto, H., Takahashi, M. and Watanabe, J. (1990). The opioid receptor selectivity for trimebutine in isolated tissue experiments and receptor binding studies. *J. Pharmacobio-Dyn.* 13, 448-453.
- 35) Karaki, H. and Mitsui, M. (1988). Verapamil-sensitive and less sensitive contractions in the intestinal smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci. *Jpn. J. Pharmacol.* 46, 325-330.
- 36) Karaki, H., Nakagawa, H. and Urakawa, N. (1984). Comparative effects of verapamil and sodium nitroprusside on contraction and  $^{45}Ca$  uptake in the smooth muscle of rabbit aorta, rat aorta and guinea-pig taenia coli. *Br. J. Pharmacol.* 81, 393-400.
- 37) Karaki, H., Sato, K., Ozaki, H. and Murakami, K. (1988). Effects of sodium nitroprusside on cytosolic calcium level in vascular smooth muscle. *European. J. Pharmacol.* 156, 259-266.
- 38) Kitazawa, T., Gaylinn, B.D., Denny, G.H. and Somlyo, A.P. (1991). G-protein-



- mediated  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 266, 1708- 1715.
- 39) Kobayashi, S., Gong, M.C., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1991).  $\text{Ca}^{2+}$  channel blockers distinguish between G protein-coupled pharmacomechanical  $\text{Ca}^{2+}$  release and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitization. *Am. J. Physiol.* C364-C370.
- 40) Kobayashi, S., Kitazawa, T., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P. (1989). Cytosolic heparin inhibits muscarinic and  $\alpha$ -adrenergic  $\text{Ca}^{2+}$  release in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 264, 17997-18004.
- 41) Komori, S., and Bolton, T.B. (1989). Actions of guanine nucleotides and cyclic nucleotides on calcium stores in single patch-clamped smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br. J. Pharmacol.* 97, 973-982.
- 42) Kuriyama, H. (1981). Excitation-contraction coupling in various visceral smooth muscle. in: *Smooth muscle* eds. Bulbring, E., Brading, A.F., Jones, A.W. and Tomita, T. (Edward Arnold, London) p.171-197.
- 43) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 44) Luckhoff, A. (1986). Measuring cytosolic free calcium concentration in endothelial cells with indo-1: the pitfall of using the ratio of two fluorescence intensities recorded at different wavelengths. *Cell Calcium* 7, 233-248.
- 45) Luttecke, K. (1980). A three-part controlled study of trimebutine in the treatment of irritable colon syndrome. *Curr. Med. Res. Opin.* 6, 437-443.
- 46) Mazzone, O., Trovato, G.M., Mandala, M.L. and Monello, S. (1980). Trimebutina e motilità gastrica: Studio tensiografico. *Clin. Ter.* 95, 629-635.
- 47) Moshal, M.G. and Herron, M. (1979). A clinical trial of trimebutine (Mebutine) in spastic colon. *J. Int. Med. Res.* 7, 231-234.
- 48) Nagasaki, M., Itagaki, M., Komori, S. and Ohashi, H. (1994). Effect of trimebutine on



- contractile responses in skinned ileal smooth muscle. *Jpn. J. Pharmacol.* 65, 249-255.
- 49) Nagasaki, M., Kobayashi, T. and Tamaki, H. (1991). Effects of trimebutine on cytosolic  $Ca^{2+}$  and force transitions in intestinal smooth muscle. *European J. Pharmacol.* 195, 317-321.
- 50) Nagasaki, M., Komori, S. and Ohashi, H. (1993). Effect of trimebutine on voltage-activated calcium current in rabbit ileal smooth muscle cells. *Br. J. Pharmacol.* 110, 399-403.
- 51) Nagasaki, M., Komori, S., Tamaki, H. and Ohashi, H. (1993). Effect of trimebutine on  $K^+$  current in rabbit ileal smooth muscle cells. *European J. Pharmacol.*, 235, 197-203.
- 52) Nagasaki, M., Kurosawa, H., Naito, K. and Tamaki, H. (1990). Allosteric interaction of trimebutine maleate with dihydropyridine binding sites. *European J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* 189, 71-76.
- 53) Nagasaki, M., Yamada, K., Ikezawa, K. and Tamaki, H. (1989). Contribution of peripheral opioid receptors to the trimebutine-induced contractions of the proximal colon in anesthetized rats. *Jpn. J. Smooth Muscle Res.* 25, 27-30.
- 54) Naito, K., McKenna, E., Schwartz, A. and Vaghy, P.L. (1989). Photoaffinity labeling of the purified skeletal muscle calcium antagonist receptor by a novel benzothiazepine, [ $^3H$ ] azidobutyl diltiazem. *J. Biol. Chem.* 264, 21211-21214.
- 55) Nishimura, J., Kolber, M. and van Breemen, C. (1988). Norepinephrine and  $GTP-\gamma-S$  increase myofilament  $Ca^{2+}$  sensitivity in  $\alpha$ -toxin permeabilized arterial smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 677-683.
- 56) Nishimura, J. and van Breemen, C. (1989). Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 929-935.
- 57) Ohashi, H., Takewaki, T. and Okada, T. (1974). Calcium and the contractile effect of carbachol in the depolarized guinea-pig taenia caecum. *Jpn. J. Pharmacol.* 24, 601-611.
- 58) Ohya, Y., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987). Cellular calcium regulates outward



- currents in rabbit intestinal smooth muscle cell. *Am. J. Physiol.* 252, C401-C410.
- 59) Ohya, Y., Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1986). Membrane currents recorded from a fragment of rabbit intestinal smooth muscle cell. *Am. J. Physiol.* 251, C335-C346.
- 60) Pascaud, X., Roman, F., Petoux, F., Vauche, D. and Junien, J.L. (1987). Action de la trimebutine sur la motricite gastro-intestinale. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 11, 77B-81B.
- 61) Sakai, T., Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1988). Ryanodine inhibits the Ca-dependent K current after depletion of Ca stored in smooth muscle cells of the rabbit ileal longitudinal muscle. *Br. J. Pharmacol.* 95, 1089-1100.
- 62) Sanguinetti, M.C. and Kass, R.S. (1984). Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ. Res.* 55, 336-348.
- 63) 佐々木大輔. (1985). 大腸運動に対する Trimebutine maleate (Cerekinon)の作用についての検討. *Ther. Res.* 3, 788-796.
- 64) Striessnig, J., Knaus, H.G. and Glossmann, H. (1988). Photoaffinity-labelling of the calcium-channel-associated 1,4-dihydropyridine and phenylalkylamine receptor in guinea-pig hippocampus. *Biochem. J.* 253, 39-47.
- 65) Suematsu, E.M., Hirata, M., Hashimoto, T. and Kuriyama, H. (1984). Inositol 1,4,5-trisphosphate releases  $Ca^{2+}$  from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 481-485.
- 66) 竹永秀幸、曲淵徹雄、玉木元 (1982). モルモット摘出胃運動に対する Trimebutine maleate (TM-906)の作用. *日薬理誌* 80, 163-168.
- 67) Takenaga, H., Magaribuchi, T. and Tamaki, H. (1984a). Effects of trimebutine maleate (TM-906) on the spontaneous contraction of isolated guinea pig colon. *Jpn. J. Pharmacol.* 34, 177-181.
- 68) Takenaga, H., Magaribuchi, T. and Tamaki, H. (1984b). Effects of trimebutine maleate



- (TM-906) on the smooth muscle of isolated guinea pig gallbladder. *Jpn. J. Pharmacol.* 34, 439-443.
- 69) Takenaga, H., Magaribuchi, T. and Tamaki, H. (1986). Effects of trimebutine maleate (TM-906) on the spontaneous contraction of isolated duodenum and ileum in both guinea pigs and rabbits. *Jpn. J. Pharmacol.* 40, 13-20.
- 70) Taniyama, K., Sano, I., Nakayama, S., Matsuyama, S., Takeda, K., Yoshihara, C. and Tanaka, C. (1991). Dual effect of trimebutine on contractility of the guinea pig ileum via the opioid receptors. *Gastroenterology* 101, 1579-1587.
- 71) Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987a). Blocking actions of  $Ca^{2+}$  antagonists on the  $Ca^{2+}$  channels in the smooth muscle cell membrane of rabbit small intestine. *Pfluger Arch.* 408, 552-557.
- 72) Terada, K., Kitamura, K. and Kuriyama, H. (1987b). Different inhibition of the voltage-dependent  $K^+$  current by  $Ca^{2+}$  antagonists in the smooth muscle cell membrane of rabbit small intestine. *Pflugers Arch.* 408, 558-564.
- 73) Tomita, T. (1981). Electrical activity (Spikes and slow waves) in gastrointestinal smooth muscles, in: *Smooth Muscle* eds. Bulbring, E., Brading, A.F., Jhones, A.W. and Tomita, T. (Edward Arnold, London) p.127-156.
- 74) 常岡健二、三好秋馬、川上澄、関口利和、中澤三郎、三輪剛。(1987). 過敏性腸症候群に対する TM-906 (Trimebutine maleate)の臨床的有用性 -臭化メペンゾラートとの比較試験-. *臨床評価* 15, 307-334.
- 75) Varoli, R., Shannon, S., Reddy, N., Daniel, E.E. and Collins, S.M. (1987). The action of trimebutine maleate on gastrointestinal motility is mediated by opiate receptors in human subjects. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 11, 102B-104B.







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

