

下部食道括約筋における substance P の収縮作用

安藤 彰 朗

(健康栄養学科)

Substance P-induced Contractions in the Lower Esophageal Sphincter

Akiro Ando

キーワード：Substance P 収縮作用 下部食道括約筋

1. はじめに

Substance P (SP) を含有する神経は、胃・食道接合部を含む消化管全域の管壁に分布しており (Bartho and Holzer, 1985; Costa *et al.*, 1981; Daniel *et al.*, 1985; Domoto *et al.*, 1983; Ekblad *et al.*, 1987)、消化管の運動調節に深く係わっている。また、SPは消化管の管壁を構成する輪走筋及び縦走筋に対して強い収縮作用を示すことが知られている (Bartho and Holzer, 1985; Costa *et al.*, 1985; Domoto *et al.*, 1983; Lidberg *et al.*, 1982; Kohjitani *et al.*, 1996)。胃・食道接合部に存在する下部食道括約筋 (LES) は静止時においても持続的に緊張を維持し、胃内容物の逆流防止を果たしている。

In vitroでの実験によると、ネコ食道輪走筋 (Leander *et al.*, 1982)、胃体部及び幽門洞の輪走筋 (Merlo and Cohen, 1989) ではSPによって誘発される収縮はatropineで抑制されるので、収縮作用の一部はacetylcholineの放出を介して生じるとされている。一方、ネコ幽門括約筋 (Merlo and Cohen, 1989) ではSPの収縮作用はatropine非感受性であるとされている。また、小腸の平滑筋では

(Holzer and Petesche, 1983; Holzer and Lippe, 1984, 1985)、SPは細胞外からのカルシウムイオンの流入とイノシトールリン脂質の分解産物による細胞内の貯蔵カルシウムイオンの放出の双方の機構によって、カルシウムイオンの細胞内濃度を増加させることが報告されている。しかしながら、SPによるLESの収縮に係わるカルシウムイオンの放出についての研究は少ない。本稿では、SPに誘発されるイヌLESの収縮について、収縮特性を調べると共に、acetylcholineの放出の関与およびSPによるカルシウム動員の経路について検討した。

2. 方法

下部食道括約筋における収縮特性を調べるため、雑種成犬のLESから作成した筋条片 (幅約2mm×長さ約10mm) を用いてマグヌス法で張力を記録した。すなわち、筋条片を後述するクレブス液を含むマグヌス管 (3.5ml) に保生し、37℃に維持した。クレブス液には95%O₂ - 5%CO₂の混合気体を継続的に通気した。張力については等張性に記録した。本実験は島根医科大学 (現島根大学医学部) 動物実験施設の規則に従って行なわれた。

筋条片に負荷が加わらない状態で約1時間保生した後、筋条片の長さを計測し、この長さを静止長とした。筋条片を静止長のおよそ200%の長さに引き伸ばし、張力が安定するまで保生した。この段階で電気刺激(50V、10Hz、0.5あるいは1msec、5sec)によって弛緩した筋条片を括約筋と同定した。

SPの用量作用曲線については、SPの累積的な投与によって得た。 10^{-5} Mのacetylcholineはacetylcholineによる最大収縮とほぼ同等の収縮を引き起こした。抗コリン作用薬atropine (10^{-5} M)、カルシウムチャンネル阻害薬verapamil (10^{-5} M)とdiltiazem (10^{-5} M)、および細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウムイオン放出抑制薬procaine (3×10^{-3} M)の影響を調べる実験では、これらの薬剤投与前のSP (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M)の収縮反応を対照とし、投与後の薬剤存在下の収縮反応と比較した。薬剤の十分な効果を得るため、処理時間はatropineで約10分、verapamilおよびdiltiazemで約1時間、procaineで約20分とした。カルシウムフリークレブス液中(1mM EGTAを含む)におけるSP (10^{-6} M)の収縮作用については、クレブス液をカルシウムフリークレブス液に置換後、15分後のSPの収縮を記録した。

クレブス液の組成については、NaCl 115.5mM、KCl 4.16mM、CaCl₂ 2.5mM、MgSO₄ 1.16mM、NaH₂PO₄ 1.16mM、NaHCO₃ 1.16mM、dextrose 11.1mMで作成した。カルシウムフリークレブス液については、上記クレブス液からCaCl₂ 2.5mMを除外し、EGTA 0.1mMを加えて調整した。また、SPはペプチド研究所製を、硫酸atropine、diltiazem、verapamilは和光純薬製を、塩酸procaineはSigma製を用いた。

SPの用量反応曲線を調べる実験においては、 10^{-5} MのSPによる収縮を収縮強度の基準(100%)とし、その他の収縮実験においては、 10^{-5} M濃度のacetylcholineによる収縮反応を収縮強度の基準(100%)とした。用いた筋条片の数をnで示した。有意差については、有意水準5%でStudentのt検定を行なった。

3. 結果

SPはLES筋条片において強力な収縮を引き起こした(図1)。張力はおよそ2~3分後に最大に達し、その後漸次僅かに低下した後、持続性の張力を維持した。 10^{-6} MのSPによる収縮反応(平均±SD)は、 10^{-5} Mのacetylcholineによる収縮反応の $174.1 \pm 49.3\%$ (n=30)に達した。また、SPは濃度依存性にLES筋条片の収縮を誘発した(図2)。収縮作用を示すSPの閾値は 10^{-10} Mであり、EC₅₀は(平均±SD) $3.0 \times 10^{-8} \pm 8.0 \times 10^{-9}$ M (n=4)であった。

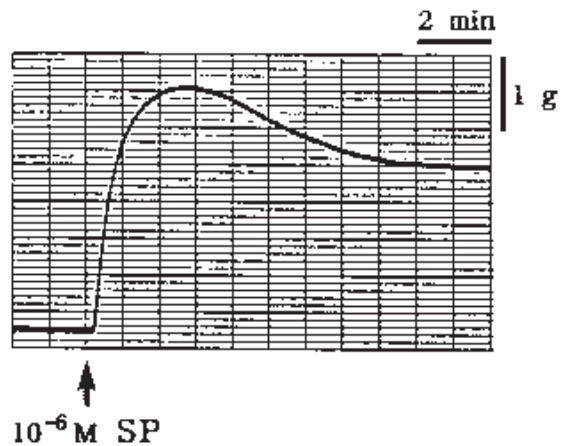


図1 SP (10^{-6} M) による収縮の張力曲線

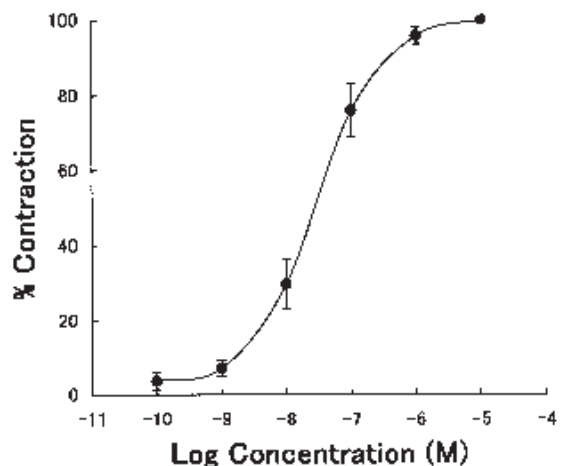


図2 SPの容量作用曲線 (n=4) SP (10^{-5} M) による収縮を100%とする。縦線はSEを示す。

LES平滑筋では、比較的低濃度のSP (10^{-8} M、 10^{-7} M) で誘発された収縮はatropine (10^{-5} M) に影響されたが、高濃度のSP (10^{-6} M) による収縮はatropineの影響を受けなかった (図3)。カルシウムチャンネル阻害薬diltiazem (10^{-5} M) は、SP (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M) による収縮を低下させた (図4)。 10^{-6} M濃度のSPによる収縮反応は、diltiazem存在下で対照 (非存在下) の約19%まで低下した。また、SP (10^{-8} M、 10^{-7} M、 10^{-6} M) の収縮反応は、別のカルシウムチャンネル阻害薬verapamil (10^{-5} M) によって有意に抑制された (図5)。 10^{-6} M濃度のSPによる収縮反応は、verapamil存在下で対照 (非存在下) の約20%まで低下した。クレープス液をカルシウムフリークレープス液に置き換えた条件化では、液の置換後15分経過した段階において、SP (10^{-6} M) による収縮反応は置換前の収縮高の約37%に低下した (データ未掲載)。

平滑筋のカルシウム貯蔵部位からカルシウムイオンの放出を抑制することが知られているprocainelは、

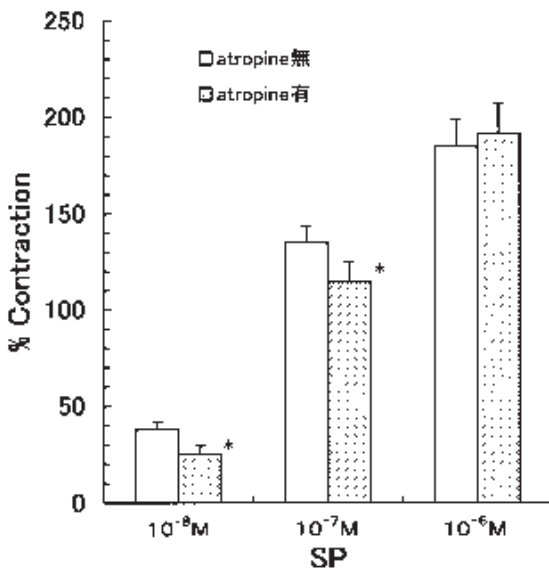


図3 SPの収縮作用に対するatropine (10^{-5} M) の影響 (n = 18)

acetylcholine (10^{-5} M) による収縮を100%とする。縦線はSEを示す。
*は有意差 (有意水準5%) を示す。

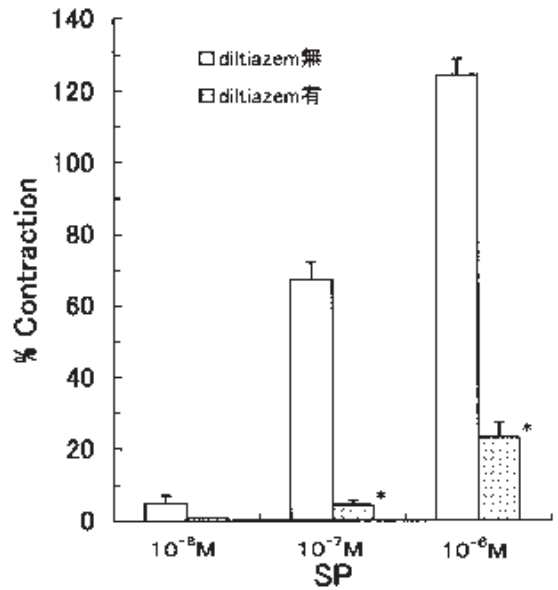


図4 SPの収縮作用に対するdiltiazem (10^{-5} M) の影響 (n = 3)

acetylcholine (10^{-5} M) による収縮を100%とする。縦線はSEを示す。
*は有意差 (有意水準5%) を示す。

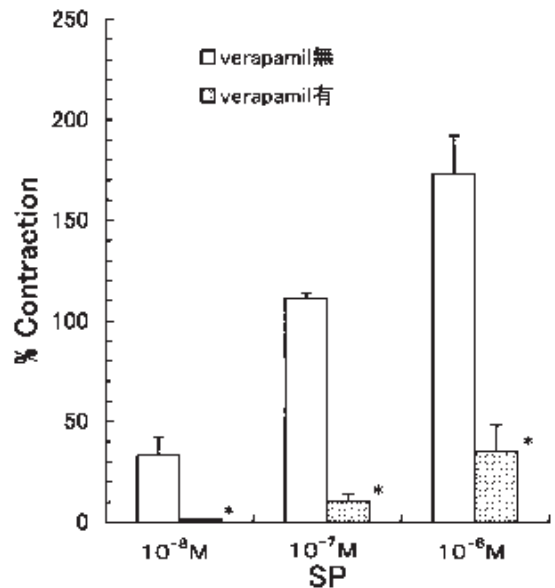


図5 SPの収縮作用に対するverapamil (10^{-5} M) の影響 (n = 6)

acetylcholine (10^{-5} M) による収縮を100%とする。縦線はSEを示す。
*は有意差 (有意水準5%) を示す。

SPによる収縮を有意に抑制した(図6)。SPの 10^{-8} M、 10^{-7} Mおよび 10^{-6} Mによって誘発された張力は、予めprocaine (3×10^{-3} M)を投与しておくと、それぞれ対照(投与前)の約1%、約13%および約30%に低下した。

4. 考察

atropineはmuscarinic受容体に結合し、acetylcholineの作用を特異的に阻害する。SPに対するatropineの影響に関しては、イヌやオポッサムなど数種の動物の消化管を用いた多くのin vivoあるいはin vitroの研究がある。本研究におけるイヌLESのSPによる収縮は、比較的低濃度ではatropineに影響されるが、高濃度では影響されなかった。同様の結果がイヌ回腸におけるin vivoの実験で知られている(Daniel *et al.*, 1982)。これらの事実は、低濃度のSPによる平滑筋の収縮の一部にはacetylcholineの放出が関与しているが、高濃度のSPでは、SPの強力な収縮作用によって、atropineの影響が隠された

ことを示唆する。他方で、SPに誘発される収縮に関連して、atropine非感受性の収縮がin vitroの研究でネコ幽門括約筋(Merlo and Cohen, 1989)やイヌ胃平滑筋(Fox *et al.*, 1983)で、in vivoの研究でイヌ回腸(Daniel *et al.*, 1982)で認められている。また、イヌ胃体では、SPの作用はin vivoでatropineによって抑制されるのに対し、in vitroでは影響を受けないという報告もある(Fox *et al.*, 1983)。SPの作用メカニズムは複雑であり、SPの収縮作用には消化管の部位間や種間で相違が認められる。本実験の結果に関する限り、LES筋条片において低濃度のSPの収縮作用はatropineによって若干抑制されるものの、高濃度のSPの収縮作用はatropineの影響を受けないことから、SPはLES平滑筋に直接作用をすると考えられる。消化管平滑筋において、SPの受容体として関係が深いtachykinin受容体の重要な働きが示唆されている(Maggi *et al.*, 1990; Rothstein *et al.*, 1991; De Schepper *et al.*, 2005, 2006)。

消化管を含む様々な組織の平滑筋において、カルシウムイオンが重要な役割を演じていることはよく知られている。テンジクネズミの小腸縦走筋では、SP受容体の活性化に伴う細胞内カルシウムの動員機構が知られているが(Holzer and Lippe, 1984)、細胞外からのカルシウムイオンの流入も起こるとの報告がある(Fujisawa and Ito, 1982; Holzer and Petsche, 1983)。SPによるイヌLESの収縮は、カルシウムチャンネル阻害薬であるverapamilやdiltiazemを投与すると抑制された。このことは、SPによる最大張力の発生に少なくともカルシウムチャンネルを通しての細胞外カルシウムイオンの流入が不可欠であることを示唆している。更に、SPの収縮高がカルシウムフリークレブス液中で低下したことは、細胞外のカルシウムイオンの重要性を示すものであり、上述の示唆を裏付けている。SPは細胞膜を脱分極させるが、高カリウム液中で脱分極状態にされた小腸縦走筋では、SPで誘発される収縮は一過性の小さなものである(Holzer and Lippe, 1984)。これらのことから、イヌ平滑筋においてもSPは電位依存性のカルシウムチャンネルを作動させて、細

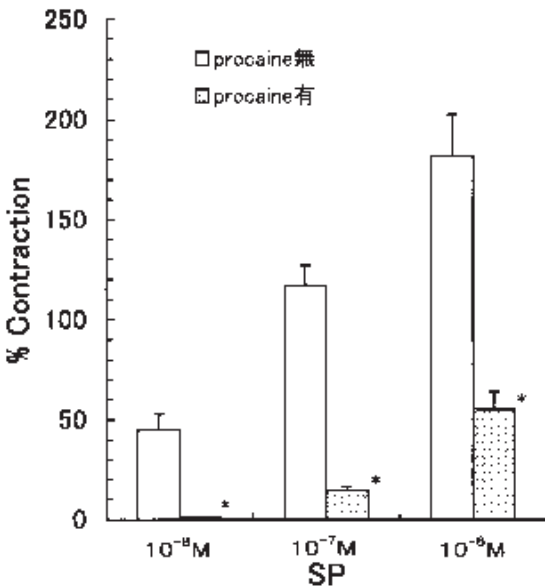


図6 SPの収縮作用に対するprocaine (3×10^{-3} M)の影響 (n = 6)
 acetylcholine (10^{-5} M)による収縮を100%とする。縦線はSEを示す。
 *は有意差(有意水準5%)を示す。

胞外からのカルシウムの流入を引き起こしていると考えられる。

本実験では、SPの収縮反応はカルシウムフリー Krebs液で細胞外のカルシウムを除去した条件下で完全に消失しなかった。一般的に、カルシウムフリー Krebs液中でのアゴニストによる収縮反応の存在は、アゴニストが細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオンを動員することによって生じるものと考えられている。従って、今回の結果はカルシウムフリー Krebs液中のLESにおいてもSPが細胞内貯蔵部位からカルシウムイオンを放出させた可能性を示している。細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオンの放出を確認するには、カルシウムイオンの放出を抑制する薬物の影響を調べる必要があるが、procaineは平滑筋のカルシウム貯蔵部位と考えられている筋小胞体に作用し、小胞体からのカルシウムイオンの放出を抑制することが知られている (Imai *et al.*, 1984; 遠藤, 1988)。本実験において、SPによるLESの収縮反応はprocaineによって抑制されたことから、SPには細胞内カルシウム貯蔵部位からカルシウムイオンを放出させる作用があると思われる。アゴニストによる受容体の活性化と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に連結する情報伝達経路の一つとして、ホスホリパーゼC・イノシトール三リン酸系がある。受容体によるGTP結合タンパク質を介した反応系の活性化によって生産されたイノシトール三リン酸が、細胞内のカルシウム貯蔵部位からカルシウムイオンを放出させ、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる。SPを含むtachykininの作用に関して、消化管平滑筋においてもこの情報伝達系が作動することによって最終的に平滑筋が収縮すると考えられている (Otsuka and Yoshioka, 1993)。

LESにおけるSPの作用について、SPは平滑筋に直接作用し、電位依存性のカルシウムチャンネルを通してのカルシウムイオンの流入および細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオン放出によって、強力な収縮を引き起こされることが再確認された。また、LESにおいても細胞内貯蔵部位からのカルシウムイオン放出にホスホリパーゼC・イノシトール三

リン酸系の活性化が働いていると考えられる。

謝辞

本稿を纏めるに当たり終始激励を賜った島根県立大学短期大学部健康栄養学科の皆様にご感謝の意を表す。また、本実験は島根医科大学 (現島根大学医学部) 解剖学教室において行なわれたものであり、御指導を賜った同教室の皆様にご謝意を表す。

引用文献

- Bartho L, Holzer P.: Search for physiological role of substance P in the gastrointestinal motility. *Neuroscience* 16: 1-32. (1985)
- Costa M, Furness JB, Llewellyn-Smith IJ, Cuello C.: Projections of substance P-containing neurons within the guinea-pig small intestine. *Neuroscience* 6: 411-424. (1981)
- Costa M, Furness JB, Pullin CO, Bornstein J.: Substance P enteric neurons mediate non-cholinergic transmission to the circular muscle of the guinea-pig intestine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 328: 446-453. (1985)
- Daniel EE, Costa M, Furness JB, Keast JR.: Peptide neurons in the canine small intestine. *J Comp Neurol.* 237: 227-38. (1985)
- Daniel EE, Gonda T, Domoto T, Oki M.: The effects of substance P and met5-enkephalin in dog ileum. *Can J Physiol Pharmacol.* 60: 830-840. (1982)
- De Scheper HU, De Winter BY, Seerden TC, Herman AG, Pelckmans PA, De Man JG.: Functional characterization of tachykinin receptors in the circular muscle layer of the mouse ileum. *Regul Pept.* 130: 105-115. (2005)
- De Scheper HU, De Winter BY, Seerden TC, Herman AG, Pelckmans PA, De Man JG.: The role of tachykinins in the circular muscle contractility of the murine ileum: a

- fuctional investigation. *Auton Neurosci.* 126-127: 273-276. (2006)
- Domoto T, Jury J, Berezin I, Fox JET, Daniel EE.: Does substance P comediate with acetylcholine in the nerves of opossum esophageal muscularis mucosa? *Am J Physiol.* 245: G19-28. (1983)
- Ekblad E, Winther C, Ekman R, Hakanson R, Sundler F.: Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine. *Neuroscience* 20: 169-188. (1987)
- 遠藤 實: 平滑筋のCa動員と収縮. 実験医学 6: 1358-1363. (1988)
- Fox JET, Daniel EE, Fox AE, Collins SM.: Sites and mechanisms of the action of neuropeptides on canine gastric motility differ in vivo and in vitro. *Life Sci.* 33: 817-825. (1983)
- Fujisawa K, Ito Y.: The effect of substance P on smooth muscle cells and on neuro-effector transmission in the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* 76: 279-290. (1982)
- Holzer P, Lippe IT.: Substance P can contract the longitudinal muscle of the guinea-pig small intestine by releasing intracellular calcium. *Br J Pharmacol.* 82: 259-267. (1984)
- Holzer P, Lippe IT.: Substance P action on phosphoinositides in the guinea-pig intestinal muscle: a possible transduction mechanism? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 329: 50-55. (1985)
- Holzer P, Petsche U.: On the mechanism of contraction and desentitisation induced by substance P in the intestinal muscle of the guinea-pig. *J Physiol (Lond).* 342: 549-568. (1983)
- Imai S, Nakazawa M, Imai H, Nabata H.: Effects of procaine on the isolated dog coronary artery. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 271: 98-105. (1984)
- Kohjitani A, Shirakawa S, Okada S, Obara H.: Effects of various peptides on isolated rabbit lower esophageal sphincter. *Peptides* 17: 927-931. (1996)
- Leander S, Brodin E, Hakanson R, Sundler F, Uddman R.: Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity. *Acta Physiol Scand.* 115: 427-435. (1982)
- Lidberg P, Edin R, Lundberg JM, Dahlstrom A, Rosell S, Folkers K, Ahlman H.: The involvement of substance P in the vagal control of the feline pylorus. *Acta Physiol Scand.* 114: 307-309. (1982)
- Maggi CA, Patacchini R, Giacetti A, Meli A.: Tachykinin receptors in the circular muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol.* 101: 996-1000. (1990)
- Merlo A, Cohen S.: Mechanics and neuropeptide responses of feline pylorus and gastric muscle in vitro. *Am J Physiol.* 256: G862-867. (1989)
- Otsuka M, Yoshioka K.: Neurotransmitter function of Mammalian tachykinins. *Physiol Rev.* 73: 229-308. (1993)
- Rothstein RD, Johanson E, Ouyang A.: Distribution and density of substance P receptors in the feline gastrointestinal tract using autoradiography. *Gastroenterology* 100: 1576-1581. (1991)

(平成19年11月27日受理)