

学 位 論 文 題 名

カルバコール、コレシストキニン刺激によって始動する刺激
－放出連関に及ぼす局所麻酔薬の抑制作用について：
ラット膵腺房における解析

学位論文内容の要旨

刺激－放出連関という言葉は副腎髄質からのカテコールアミンの分泌反応において、アセチルコリン(ACh)刺激によって開始される一連の細胞内での事象について用いられたものである。その後、膵臓の外分泌細胞を含む多種多様な分泌系にも用いられるようになり、細胞内 Ca^{2+} がこれら連関の重要なシグナルであることが知られている。膵外分泌反応は、多種類の受容体を介して調節されているが、代表的な生理活性物質にはACh、コレシストキニン－パンクレオザイミンがあり、細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の動態を変化させ消化酵素の放出を刺激する。

副腎髄質細胞においてテトラカインはACh刺激によるカテコールアミン分泌を抑制し、その機構が細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入抑制にあることが報告されている。神経細胞では局所麻酔薬が Ca^{2+} チャンネルを始めとする様々なイオンチャンネルを抑制し、筋標本ではプロカインは Ca^{2+} 誘発性の Ca^{2+} 放出やカフェイン誘発性 Ca^{2+} 放出を抑制している。

今回の実験には、ラット遊離膵腺房標本を用い、 Ca^{2+} 感受性のある蛍光色素、Fura-2を用いた $[Ca^{2+}]_i$ 測定と分泌測定を組み合わせを行い、AChの誘導体であるカルバコール(CCh)あるいはコレシストキニン－オクタペプチド(CCK-8)がそれぞれの受容体に結合するところから開始される刺激－放出連関における $[Ca^{2+}]_i$ の役割を局所麻酔薬、プロカインを用いて薬理的に分析した。分泌反応に対するプロカインの抑制効果を解置法で検討した後、 $[Ca^{2+}]_i$ の変化と分泌反応の変化を時間的に対応させながら解析するため、標本を周辺灌流して検討した。また、プロカインを初めとする局所麻酔薬はムスカリン受容体を受容体レベルで抑制することも知られているが、その作用については一定の見解が得られておらず、局所麻酔薬の種

類によりムスカリン受容体への作用やその他の効用が異なるようである。そこで、ムスカリン受容体のリガンドである[N-methyl- ^3H]-scopolamine chloride (^3H -NMS)とボルトンとハンター法にて ^{125}I を標識したCCK-8 (^{125}I -BH-CCK-8)を用いてムスカリン受容体あるいはCCK受容体の結合実験を行い、CChあるいはCCK-8のそれぞれの受容体との結合に対するプロカインの効果を検討した。

ムスカリン受容体は各種アンタゴニストを用いた薬理学的な実験から、現在では M_1 、 M_2 、 M_3 、 M_4 に分類され、膵腺房細胞は M_3 に分類されている。ムスカリン受容体の M_1 、 M_2 の各亜型に対する各種局所麻酔薬の親和性は異なり、局所麻酔薬に対する親和性の相違により、ムスカリン受容体の亜型分類の可能性もある。そこで、CCh刺激によって引き起こされる膵外分泌ならびに ^3H -NMSの膵腺房との結合に対する各種局所麻酔薬、テトラカイン、プロカイン、アミノ安息香酸エチル、リドカイン、ジブカインの抑制効果を比較検討し、合わせて各種局所麻酔薬の構造活性相関についても検討した。以上の一連の実験から以下の結論を得た。

1. 局所麻酔薬、プロカイン(0.03–10 mM)はラット遊離膵腺房細胞において各種濃度のコリン作動性刺激物質、CCh刺激によって引き起こされるアミラーゼ分泌を抑制した。各種濃度のプロカイン存在下におけるアミラーゼ分泌量とCCh濃度との関係を分析すると、プロカインはCChの受容体への結合を競合的に抑制していることが示唆され、プロカインの親和定数、 pA_2 は 5.00 ± 0.08 であった。
2. 受容体結合実験の結果からも、各種濃度のプロカイン(0.01–10 mM)は競合的に ^3H -NMSのムスカリン受容体への結合を阻害することが確認された。プロカインの受容体との結合定数、 pK_i は 4.63 ± 0.10 であった。
3. CCh刺激によって引き起こされる膵外分泌反応に対する各種局所麻酔薬の抑制効果は、テトラカイン＝プロカイン>ジブカイン>アミノ安息香酸エチル>リドカインの順序であった。また分泌抑制の程度は ^3H -NMSのムスカリン受容体への結合阻害の程度と良く一致した。

4. プロカイン、リドカインおよびアミノ安息香酸エチルの $[^3\text{H}]\text{-NMS}$ のムスカリン受容体への結合阻害、あるいはムスカリン性アゴニストによって引き起こされる生体反応の阻害程度を比較することにより、ムスカリン受容体の M_1 、 M_2 、 M_3 の亜型を区別できるかもしれない。また、局所麻酔薬の膵腺房細胞のムスカリン受容体との結合には、カルボニル基とアルキル基の間にある程度の距離が必要であり、カルボニル基とベンゼン環の距離が短いほうが有利であろうと推測される。また、カルボニル基はあまり大きな役割を果たしていないようである。

5. プロカインは CC h 刺激によって引き起こされる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化の様相を変えた。 $3\ \mu\text{M}$ の CC h の持続的刺激によって引き起こされる最初の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇とそれに引き続くゆっくりとした減少は、 $0.3\ \text{mM}$ プロカイン処理によって振動性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化に形を変えた。この振動性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、プロカイン非存在下での $0.3\ \mu\text{M}$ の CC h 刺激によって引き起こされる変化に酷似していた。またプロカイン存在下において、 $3\ \mu\text{M}$ の CC h 刺激によって引き起こされる第1相の振動性 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、灌流刺激した時のアミラーゼ分泌の初期相によく一致していた。

6. $0.3 - 3\ \text{mM}$ のプロカインは、 CCK-8 で孵置刺激した時のアミラーゼ分泌を抑制しなかった。しかし、 $10\ \text{mM}$ の高濃度プロカインは、 $30\ \text{pM}$ と $100\ \text{pM}$ の CCK-8 刺激時のアミラーゼ分泌のみを有意に抑制した。 $3\ \text{mM}$ 以下のプロカインは、 $[^{125}\text{I}]\text{-BH-CCK-8}$ と膵腺房の受容体との結合に効果はなかったが、 $10\ \text{mM}$ プロカインは、僅かではあるが有意な結合抑制を引き起こした。

7. プロカインは、持続的な CCK-8 刺激によって引き起こされる最初の一時的な $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇を抑制した。そしてこの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化は、分泌反応における初期相での有意な抑制と呼応していた。しかしながら、 CCK-8 によって引き起こされる分泌反応に対するプロカインの影響は僅かであり、初期相に引き続く持続的な第二相には殆ど効果はなかった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	菅野 富夫
副査	教授	中里 幸和
副査	教授	斉藤 昌之
副査	助教授	原田 悦守

学位論文題名

カルバコール, コレシストキニン刺激によって始動する刺激
—放出連関に及ぼす局所麻酔薬の抑制作用について:
ラット膵腺房における解析

膵外分泌線は、膵腺房組織と膵導管組織によって構成されている。膵腺房組織の分泌反応は、主として、迷走神経系を介する神経性調節と、コレシストキニン(CCK)による内分泌性調節を受けている。これら調節の機構を解析するために、申請者、池井暢浩氏は局所麻酔薬を用いて実験を行い、次のような結果を得た。

局所麻酔薬、プロカイン (0.03–10mM) はラット遊離膵腺房細胞において各種濃度のコリン作動性刺激物質、カルバコール(carbachol, 以下CChと省略する) 刺激によって引き起こされるアミラーゼ分泌を抑制した。各種濃度のプロカイン存在下におけるアミラーゼ分泌量とCCh濃度との関係を分析すると、プロカインはCChの受容体への結合を競合的に抑制していることが示唆され、プロカインの親和定数、 pA_2 は 5.00 ± 0.08 であった。

受容体結合実験の結果からも、各種濃度のプロカイン (0.01–10mM) は競合的に[N-methyl- 3H]-scopolamine chloride (以下 3H]-NMSと省略する) のムスカリン受容体への結合を阻害することが確認された。プロカインの受容体との結合定数、 pK_i は 4.63 ± 0.10 であった。CCh刺激によって引き起こされる膵外分泌反応に対する各種局所麻酔薬の抑制効果は、テトラカイン=プロカイン>ジブカイン>アミノ安息香酸エチル>リドカインの順序であった。また分泌抑制の程度は 3H]-NMSのムスカリン受容体への結合阻害の程度と良く一致した。プロカインはCCh刺激によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度(以下 $[Ca^{2+}]_i$ と省略する) の変化の様相を変えた。3 μ MのCChの持続的刺激によって引き起こされる最初の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とそれに引き続くゆっくりとした減少は、0.3mMプロカイン処理によって振動性の $[Ca^{2+}]_i$ 変化に形を変えられた。この振動性の $[Ca^{2+}]_i$ 変化は、プロカイン非存在下での0.3 μ MのCCh刺激によって引き起こされる変化に酷似していた。またプロカイン存在下において、3 μ MのCCh刺激によって引き起こされる第1相の振動性 $[Ca^{2+}]_i$ 変化は、灌流刺激した時のアミラーゼ分泌の初期相によく一致していた。

0.3–3mMのプロカインは、コレシストキニン–オクタペプチド(以下CCK-8と省略する) で孵置刺激した時のアミラーゼ分泌を抑制しなかった。しかし、10mMの高濃度プロカインは、30pMと100pMのCCK-8刺激時のアミラーゼ分泌のみを有意に抑制した。3mM以下のプロカインは、Bolton-Hunter法にて ^{125}I を標識したCCK-8と膵腺房の受容体と

の結合に効果はなかった。プロカインは、持続的なCCK-8刺激によって引き起こされる最初の一時的な $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を抑制した。そしてこの $[Ca^{2+}]_i$ の変化は、分泌反応における初期の相での有意な抑制と呼応していた。以上の結果から、池井氏は次のような結論を導いた。ラット遊離膵腺房標本において、プロカインはムスカリン受容体の競合的なアンタゴニストであり、CCK-8によって引き起こされる分泌反応においては初期の分泌相においてのみ僅かな抑制効果を引き起こす。この研究は、膵外分泌反応の神経性調節と内分泌性調節とをプロカインによって区別することができることを示すものであり、基礎獣医学に寄与するところが大きい。よって、審査担当者一同は、申請者、池井暢浩氏が博士（獣医学）を受ける資格があるものと認めた。