

# J. 日本比較薬理学・毒性学会

## シンポジウム

3月31日(月) 9:00~12:00 第8会場  
情報伝達系を担う鍵物質・分子のバイオイメージング  
J-S-1 - 4

3月31日 9:00 -12:00

堀正敏 (東大)、海野年弘 (岐阜大)

- J-S-1 In situ でのリゾホスファチジン酸によるマウス大動脈内皮細胞の流れ刺激誘発性  $Ca^{2+}$  応答の増強  
大幡久之<sup>1</sup>、新岡丈治<sup>1</sup>、山田英之<sup>1</sup>、山本雅幸<sup>1</sup>、百瀬和享<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>昭和大・薬・薬理 )
- J-S-2 細胞機能を覗く分子デザイン  
菊地和也<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東京大学大学院薬学系研究科, 科技団さきがけ )
- J-S-3 プロテインキナーゼCサブタイプのイメージングによる機能解析  
斎藤尚亮<sup>1</sup>、白井康仁<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>神戸大・バイオシグナル研 )
- J-S-4 シグナル伝達機構の動的解明を目指すイメージング  
廣瀬謙造<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東京大・医・細胞分子薬理 )

## 一般口演

4月1日(火) 9:00~11:20 第8会場  
J-1 - 14

4月1日 9:00 -9:50 リン酸化による制御機構

斉藤真也 (東北大)、宮本篤 (鹿児島大)

- J-1 細胞内小胞輸送制御に関わる細胞内膜系局在三量体 G タンパクの活性化によるシグナリング  
中川博史<sup>1</sup>、清宮健一<sup>1</sup>、松尾三郎<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>大阪府大院・獣医・毒性 )
- J-2 Integrin-linked kinase (ILK) の不活化は tau の高度リン酸化を引き起こす  
石井利明<sup>1</sup>、古岡秀文<sup>2</sup>、室井喜景<sup>1</sup>、西村昌数<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>帯畜大・獣医・病態獣医・薬理、<sup>2</sup>帯畜大・獣医・病態獣医・病理 )
- J-3 摘出ブタ脳底動脈のアンジオテンシン II による血管反応へのチロシンキナーゼの関与  
宮本 篤<sup>1</sup>、西木戸優子<sup>1</sup>、和田涼子<sup>1</sup>、石黒 茂<sup>1</sup>、西尾 晃<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>鹿児島大・家畜薬理 )
- J-4 ラット大動脈平滑筋における MEK 阻害剤による収縮抑制に関連する MAP キナーゼのサブタイプ  
斉藤真也<sup>1</sup>、伊藤彩子<sup>1</sup>、大泉康<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>東北大院・薬 )
- J-5 コラーゲンによる血小板濃染顆粒からの放出反応に関与する機構の動物種による相違  
川島幸子<sup>1</sup>、本田直史<sup>1</sup>、伊藤勝昭<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>宮崎大・農・家畜薬理 )

4月1日 9:50 -10:50 酸化ストレスと NO

稲波修 (北大)、竹内正吉 (大阪府大)

- J-6 マウスにおける benzo[a]pyrene 誘発性小核形成に及ぼす 4-hydroxy furanone 化合物の二面作用  
鈴木忠彦<sup>1</sup>、須田朋洋<sup>1</sup>、堤賢一<sup>2</sup>、菅原悦子<sup>3</sup>、佐藤至<sup>4</sup>、小林晴男<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>岩手大・獣医薬理、<sup>2</sup>岩手大・農・寒冷バイオ、<sup>3</sup>岩手大・教育・家政教育、<sup>4</sup>岩手大・獣医公衆衛生 )

- J-7 マクロファージ IL-1 産生における NADPH オキシダーゼ由来活性酸素種の役割  
稲波修<sup>1</sup>、小野耕介<sup>1</sup>、山盛徹<sup>1</sup>、桑原幹典<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大獣医・放射線 )
- J-8 分化誘導前骨髄性白血病細胞におけるアポトーシス抵抗性  
佐藤祐美子<sup>1</sup>、 清宮健一<sup>1</sup>、中川博史<sup>1</sup>、松尾三郎<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>大阪府大院・獣医・毒性 )
- J-9 ハムスター大腸のプリン作動性神経 平滑筋情報伝達に対する NO 作動性神経による抑制性調節  
松山勇人<sup>1</sup>、海野年弘<sup>1</sup>、小森成一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>岐阜大・家畜薬理 )
- J-10 マウス回腸の伸展刺激による上行性ならびに下行性反応における Cajal の重要性  
竹内正吉<sup>1</sup>、置塩豊<sup>1</sup>、藤波かおり<sup>1</sup>、藤田秋一<sup>1</sup>、畑文明<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>大阪府大院・農生命科学・応用薬理 )
- J-11 マウス回腸における SK3 channel の発現  
藤田秋一<sup>1</sup>、竹内正吉<sup>1</sup>、花井淳<sup>2</sup>、後藤博人<sup>1</sup>、藤波かおり<sup>1</sup>、末永清剛<sup>1</sup>、置塩豊<sup>1</sup>、畑文明<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>大阪府大院・農生命・獣医・応用薬理、<sup>2</sup>市立堺病院 )

4月1日 10:50 -11:20 シトクロム P450

下田実 (農工大)

- J-12 ウグイの薬物代謝酵素 P4501A をバイオマーカーに用いた港とその周辺水域の環境汚染評価  
佐治尚介<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大獣医学部毒性学教室 )
- J-13 マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構 鉄による効果  
中野賢司<sup>1</sup>、石塚真由美<sup>1</sup>、数坂昭夫<sup>1</sup>、藤田正一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大・獣医・毒性 )
- J-14 Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively  
Shaban IbrahimZein<sup>1</sup>、石塚真由美<sup>1</sup>、数坂昭夫<sup>1</sup>、藤田正一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大・獣・毒性 )

4月1日(火) 13:00~14:40 第8会場  
J-15 - 24

4月1日 13:00 -13:20 中枢

石井利明 (帯畜大)

- J-15 新生ラットの侵害受容反応に対する鎮痛薬の併用効果  
安武寿美子<sup>1</sup>、 乙黒兼一<sup>1</sup>、太田利男<sup>1</sup>、伊藤茂男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大・院・獣医・薬理 )
- J-16 The effect of three pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats  
Hossain Muhammad Mubarak<sup>1</sup>、鈴木忠彦<sup>1</sup>、佐藤至<sup>1</sup>、武脇義<sup>2</sup>、小林晴男<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>岩手大・農、<sup>2</sup>岐阜大・連合獣医 )

4月1日 13:20 -14:10 平滑筋収縮/イオンチャンネル

種池哲朗 (酪農大) 太田利男 (北大)

- J-17 モルモット盲腸紐におけるピンボセチンおよび EHNA の弛緩と環状ヌクレオチドの関連  
金田剛治<sup>1</sup>、清水一政<sup>1</sup>、中條真二郎<sup>1</sup>、浦川紀元<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>日獣大・獣医薬理 )
- J-18 ヒトおよびマウス子宮におけるバソプレッシンの収縮作用の種差について  
斉藤みのり<sup>1</sup>、川又理樹<sup>2</sup>、木村正<sup>3</sup>、高柳友紀<sup>2</sup>、西森克彦<sup>2</sup>、柳澤輝行<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>東北大院・医・分子薬理、<sup>2</sup>東北大院・農・分子生物、<sup>3</sup>大阪府立成人病センター・婦人科 )
- J-19 ブタ子宮筋 thromboxane A<sub>2</sub> ( TXA<sub>2</sub> ) 受容体の薬理的解析  
曹金山<sup>1</sup>、若月章<sup>1</sup>、北澤多喜雄<sup>1</sup>、種池哲朗<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>酪農大・獣医・薬理 )

J-20 モルモット回腸平滑筋細胞の非選択的陽イオンチャンネル活性化におけるフォスホリパーゼCの関与  
岡本寛之<sup>1</sup>、海野年弘<sup>1</sup>、鈴木麻希<sup>1</sup>、松山勇人<sup>1</sup>、小森成一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>岐阜大・農・獣医薬理 )

J-21 培養ブタ副腎髄質細胞の電位依存性 Ca チャネル活性に対する自己分泌/傍分泌性抑制機構  
太田利男<sup>1</sup>、甲斐隆彦<sup>1</sup>、伊藤茂男<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>北大・院・獣医・薬理 )

4月1日 14:10 -14:40 心血管

原幸男 (北里大)、伊藤勝昭 (宮崎大)

J-22 ドキソルピシン誘発性心毒性モデルラットにおけるトロポニン (cTnI および cTnT) の有用性の検討  
三枝由紀恵<sup>1</sup>、田畑肇<sup>1</sup>、古塚正幸<sup>1</sup>、花田貴宣<sup>1</sup>、岡宮英明<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>山之内製薬株式会社 開発本部 安全性研究所 )

J-23 ラット心肥大発症モデルにおけるヘパラーゼの発現  
木崎景一郎<sup>1</sup>、岡田宗善<sup>1</sup>、伊藤良一<sup>1</sup>、赤塚佳子<sup>1</sup>、百崎雅美<sup>1</sup>、吉岡一機<sup>2</sup>、藤森祐紀<sup>3</sup>、  
打出毅<sup>3</sup>、佐々木卓士<sup>3</sup>、天間恭介<sup>3</sup>、武藤顕一郎<sup>2</sup>、橋爪一善<sup>4</sup>、原幸男<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>北里大・獣医薬理、<sup>2</sup>北里大・獣医解剖、<sup>3</sup>北里大・毒性、<sup>4</sup>農業生物資源研・生殖再生 )

J-24 デキサメタゾンによる血管内皮細胞へのアデノウイルスベクターによる機能障害を改善し遺伝子導入効率をあげる  
村田幸久<sup>1</sup>、堀正敏<sup>1</sup>、Li Seng<sup>2</sup>、中村彰男<sup>2</sup>、小浜一弘<sup>2</sup>、尾崎博<sup>1</sup>、唐木英明<sup>1</sup>  
( <sup>1</sup>東大・農学部・獣医薬理、<sup>2</sup>群馬大学・医学部・薬理 )

## J-S-1 In situ でのリゾホスファチジン酸によるマウス大動脈内皮細胞の流れ刺激誘発性 $Ca^{2+}$ 応答の増強

大幡久之<sup>1</sup>、新岡文治<sup>1</sup>、山田英之<sup>1</sup>、山本雅幸<sup>1</sup>、百瀬和享<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>昭和大学・薬・薬理)

内皮細胞への流れ刺激に起因する血管トーン制御因子の遊離は、血行動態の制御に重要な役割を果たしているが、その分子メカニズムは未だ不明である。我々は、培養内皮細胞への流れ刺激負荷による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 上昇が、生体内活性リン脂質であるリゾホスファチジン酸 (LPA) により著明に増強されることを見出し、LPA が流れ刺激感受性を増強する内因性物質であるという仮説を提唱している。また、この  $Ca^{2+}$  応答について薬理学的及び時空的性質を詳細に検討した結果、少数単位の機械受容チャネルから流入した  $Ca^{2+}$  が細胞内を同心円状に広がる機械受容応答に特有の  $Ca^{2+}$ -シグナルとして  $Ca^{2+}$  spots と命名した。さらに、より生理的な条件下でこの仮説を検証する目的で、リアルタイム多光子励起レーザー走査顕微鏡を用いてマウス大動脈組織標本への流れ刺激で生じる内皮細胞の  $Ca^{2+}$  動態のイメージング法を確立し、LPA の作用を詳細に検討した。その結果、LPA 存在下での流れ刺激負荷による  $Ca^{2+}$  応答は、個々の細胞で異なる反復性の変動パターンを示し、その反応性は LPA 濃度 ( $1 \sim 10 \mu M$ ) 及びシアストレス強度 ( $10 \sim 40 \text{ dyne/cm}^2$ ) に依存して増大することが明らかとなった。さらに、この内皮細胞の  $Ca^{2+}$  応答に引き続いて、平滑筋細胞の  $Ca^{2+}$  オシレーションが増大し、同時に平滑筋細胞の長軸方向に沿った短縮が認められたことから、組織レベルでは収縮応答の引き金となることが示唆された。従って、LPA は内皮細胞が受容する流れ刺激を  $Ca^{2+}$  応答に変換する機構の感受性を増幅する内因性物質であり、血行動態制御に重要な役割を果たしていることが示唆された。

## J-S-3 プロテインキナーゼCサブタイプのイメージングによる機能解析

齋藤尚亮<sup>1</sup>、白井康仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大学・バイオシグナル研)

1990年代に分子生物学・生化学的な手法によって行われてきた細胞内情報伝達機構ネットワークの研究は、近年のライブイメージング技術の進歩により、新たな展開を迎えている。つまり、情報の伝達がどの分子によって行われるかばかりでなく、その分子がいつ、どこで行われるかという時間的・空間的な観点をもって解析することが必要であることが明らかになってきた。我々は、PKCを中心とする情報伝達機構のライブイメージングを行い、細胞内の情報伝達機構は、予想を越えたダイナミックなものであることを明らかにしてきた。PKCの多彩な機能は、10種以上のサブタイプが独自の機能を持っているためだけでなく、それぞれのサブタイプが刺激に応じて異なる細胞内部位に移動し、違う細胞応答を引き起こす機能、さらに、同一のPKC分子も刺激の種類によってターゲティングする標的を変化させるという機能(=ターゲティング機能)を持つことにより可能となっていると考えられる。本シンポジウムでは、PKCターゲティングのイメージング研究によって明らかになったPKCサブタイプの機能について紹介する。

## J-S-2 細胞機能を覗く分子デザイン

菊地和也<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院薬学系研究科, 科技団さきがけ)

現在、ポストゲノム時代における研究課題として細胞に作用する分子の働きを、機能しているその場で解明することが挙げられるようになった。このためには、細胞が生きたまま機能を調べることができれば有効である。この目的のため、細胞内分子と特異的に反応して可視化することができる生理機能可視化プローブをデザイン・合成し直接細胞に応用することを試みた。(1) 蛍光プローブの創製による、亜鉛イオン( $Zn^{2+}$ )等の神経作用分子及び酵素活性のイメージング 生体内において、遊離の  $Zn^{2+}$  は神経伝達に関与していることが報告され、近年着目されている。そこで、蛍光プローブ  $ZnAF-2$  の開発を行い、nM オーダーでの濃度変化を選択的に測定することを可能とした。このプローブを用いて、ラット脳海馬における  $Zn^{2+}$  濃度変化を可視化することに成功した。正常時、 $Zn^{2+}$  は CA3 において高濃度で存在するが、虚血や脱分極刺激によって CA1 において濃度上昇することが明らかになった。(2) イノシトール3リン酸( $IP_3$ )受容体のレーザー分子機能不活化 (CALI, Chromophore-assisted Laser Inactivation) 時間と場所を特定して不活性化できる方法として CALI が報告されている。 $IP_3$  受容体を標的分子として選択し、CALI 用小分子プローブ(MGIP<sub>3</sub>)を合成した。続いて、モルモットの平滑筋組織を用いて、 $IP_3$  受容体を生きた状態で特異的に不活性化できることを示した。さらに、膜透過性プローブを作製しシングルセルレベルでの不活性化にも成功した。

## J-S-4 シグナル伝達機構の動的解明を目指すイメージング

廣瀬謙造<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京大学・医・細胞分子薬理)

現代はポストゲノム時代であり、我々は己のゲノムがコードする遺伝子の大部分を知っている。その結果、生体機能を司るシグナル伝達機構についても、そのいわば青写真が完成しつつある。しかし、依然としてその青写真は「静的」な理解しか与えてくれない。生きた細胞内ではシグナル分子はその空間的・時間的な状態を常に「動的」に変化させているはずだから、どのような拳動をとってシグナル伝達機構が機能するのかを理解することが重要である。このようなシグナル伝達の動的理解こそ今後解決されるべき重要な課題と認識されつつある。蛍光イメージング技術は、直接的に生きた細胞内のシグナル分子を「見る」という戦略でこの課題にアプローチする方法である。我々はこの戦略に沿って、シグナル伝達動態の解明を目指している。現在までに、カルシウム動因を制御するイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) の細胞内ダイナミクスを可視化することに成功している。この結果、 $IP_3$  もカルシウム同様複雑な細胞内動態を示すこと、そして、そのパターンがカルシウムとの相互的フィードバックの結果生ずる可能性を見出した。また、カルシウム依存性の転写因子である NFAT の細胞内動態を可視化し、どのようにカルシウム振動が「解釈」されるのかが明らかになってきた。最近では、生理的な一酸化窒素 (NO) の受容体である可溶性グアニル酸シクラーゼをベースとした NO 蛍光プローブの開発を行い、細胞内外における NO の動態を解析する機会を得ている。細胞内情報伝達のイメージングは、そのダイナミクスと意義を明らかにする上で非常に有用であり、様々な情報伝達系についても今後その動的な理解が進むことが期待される。

## J-1 細胞内小胞輸送制御に関わる細胞内膜系局在三量体 G タンパクの活性化によるシグナリング

中川博史<sup>1</sup>、清宮健一<sup>1</sup>、松尾三郎<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪府大院・獣医・毒性)

【目的】現在までに細胞内膜系局在三量体 G 蛋白が細胞内小胞輸送を制御する可能性が報告されているが、内膜系局在三量体 G 蛋白の存在及びその下流のシグナル伝達経路は解明されていない。本実験では三量体 G タンパクを介した輸送制御系を明らかにすることを目的として、ゴルジ膜・rER 膜における三量体 G タンパクの局在を明らかにするとともに、リン酸化を指標としてエフェクタータンパクの探索を行なった。【方法】*In vivo*系としてフツ化ナトリウム投与・非投与 10~12 週齢 SD 雄ラット切歯アメロプラストをホモジナイズ後、ショ糖密度勾配遠心分離により各膜画分を得た。リン酸化タンパクはウエスタンブロットにより検出した。*In vitro*系として各膜画分を用いた cell free における G タンパク活性化を試みた。活性化には AIF<sub>4</sub> 又は GTP- S を用い、G 蛋白の存在及びその活性化は <sup>32</sup>P-NAD ADP-ribosylation assay により確認した。リン酸化タンパクの検出は <sup>32</sup>P-ATP オートラジオグラフによって行なった。【結果】ゴルジ膜画分を用いた *in vitro*の実験において三量体 G タンパクを活性化させたところ、リン酸化の強い減少が見られる三つのバンドがあり、特に約 77KDa のタンパクは *in vivo*系で見られたチロシンリン酸化の減少と一致した。また rER 膜画分においても約 44KDa のリン酸化が増加するバンドが見られた。【結論】本結果によりゴルジ膜及び ER 膜局在三量体 G 蛋白の存在が明らかとなり、下流にリン酸化の調節を受けるタンパクが各内膜系に存在することが示された。細胞内小胞輸送において、これらのタンパクリン酸化を介し制御が行なわれている可能性が考えられる。

## J-3 摘出ブタ脳底動脈のアンジオテンシン II による血管反応へのチロシンキナーゼの関与

宮本篤<sup>1</sup>、西木戸優子<sup>1</sup>、和田涼子<sup>1</sup>、石黒茂<sup>1</sup>、西尾晃<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>鹿児島大・家畜薬理)

第 134 回本学会にて、摘出ブタ脳底動脈のアンジオテンシン II (Ang II) による血管収縮反応は、血管平滑筋上に存在する AT<sub>1</sub> 受容体を介した収縮反応と内皮細胞上に存在する AT<sub>2</sub> 受容体を介した弛緩反応のバランスにより成り立っていることを AT<sub>1</sub> 受容体拮抗薬 losartan および AT<sub>2</sub> 受容体拮抗薬 PD123319 を用いて明らかにした。今回、この反応に対しチロシンキナーゼが関与しているかどうか、チロシンキナーゼ阻害剤である genistein と tyrphostin 47 およびチロシンフォスファターゼ阻害剤である orthovanadate を用いて張力実験にて検討した。それぞれの阻害剤は、Ang II 適用 30 分前に処置した。

【結果】(1) Genistein (10<sup>-5</sup> および 10<sup>-4</sup> M) は、Ang II (10<sup>-8</sup> M) による収縮反応を用量依存性に抑制した。(2) Tyrphostin 47 (10<sup>-5</sup> および 10<sup>-4</sup> M) も、Ang II による収縮反応を用量依存性に抑制した。(3) Orthovanadate (10<sup>-4</sup> M) は、Ang II 収縮反応を有意に増強した。(4) 内皮細胞を除去すると、AT<sub>2</sub> 受容体を介した弛緩反応は消失し AT<sub>1</sub> 受容体を介した収縮反応のみになるが、genistein および tyrphostin 47 はその Ang II 収縮反応を用量依存性に抑制し、orthovanadate は Ang II 収縮反応を有意に増強した。【考察】今回の実験より、摘出ブタ脳底動脈で AT<sub>1</sub> 受容体を介した Ang II による収縮反応にチロシンキナーゼの関与の可能性が示唆された。現在、チロシンキナーゼ活性を測定中である。

## J-2 Integrin-linked kinase (ILK) の不活化は tau の高度リン酸化を引き起こす

石井利明<sup>1</sup>、古岡秀文<sup>2</sup>、室井喜景<sup>1</sup>、西村昌数<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>帯畜大・獣医・病態獣医・薬理、<sup>2</sup>帯畜大・獣医・病態獣医・病理)

神経未分化細胞である N1E-115 細胞は、ラミニン上で血清無添加培養液中 (分化条件下) にて培養すると、神経突起を形成し神経細胞へと分化する。以前我々は、Integrin-linked kinase (ILK) がこの分化機構に必要な不可欠であることを報告した (J.Biol.Chem. (2001) 276,42994-43003)。今回、ILK の不活化変異体 (DN-ILK) を高発現した細胞は、tau が高度にリン酸化されることを明らかにしたので報告する。N1E-115 細胞に発現する内 ILK は、分化条件下に暴露すると一過性に高度に活性化されるが、非分化条件下においても低度の基礎活性が認められる。DN-ILK を高発現した細胞は、分化、非分化条件下にかかわらず、ILK の活性を完全に阻害した。これらの条件下で DN-ILK 発現細胞とコントロール細胞における tau のリン酸化状態について、Tau-1 抗体 (非リン酸化 tau のみを認識) とリン酸化 (S<sup>199</sup>, S<sup>202</sup>)-Tau 抗体を用いて調べた。DN-ILK 発現細胞の tau は、分化、非分化条件下にかかわらずリン酸化 (S<sup>199</sup>, S<sup>202</sup>)-Tau 抗体で認識されたが、Tau-1 抗体には反応しなかった。それとは逆に、コントロール細胞の tau は、分化、非分化条件下にかかわらず Tau-1 抗体にのみ認識された。このように、内 ILK を不活化すると tau が高度にリン酸化されることがわかった。次に、ILK 情報伝達系の下流に位置し、かつ tau の S<sup>199</sup>, S<sup>202</sup> 部をリン酸化する酵素として知られている GSK-3 の活性を調べた。GSK-3 は DN-ILK 発現細胞においてのみ、分化、非分化条件下にかかわらず高度に活性化されていた。また、GSK-3 の阻害薬である LiCl は、tau の高度リン酸化を用量依存的に阻害した。以上の成績から、内 ILK の基礎活性は GSK-3 の抑制を介して tau の高度リン酸化を阻害することが示唆された。

## J-4 ラット大動脈平滑筋における MEK 阻害剤による収縮抑制に関連する MAP キナーゼのサブタイプ

斎藤真也<sup>1</sup>、伊藤彩子<sup>1</sup>、大泉康<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北大院・薬)

【背景】PD 98059 および U0126 はいずれも高濃度で平滑筋の収縮を抑制することが知られている。PD 98059 および U0126 は MEK 1/2 を阻害することによって MAP キナーゼである ERK1/2 のリン酸化を抑制し、ERK1/2 の活性を特異的に阻害すると考えられている。しかし近年、PD 98059 が MEK5 も MEK1/2 と同程度に阻害すること、U0126 は MEK1/2 よりも親和性が劣るものやより高濃度で MEK5 を抑制することが報告された。これらのことから我々は MEK 阻害剤によるラット大動脈平滑筋収縮抑制作用を ERK1/2 のリン酸化あるいは MEK5 の下流にある ERK5 のリン酸化に対する作用と比較検討した。

【結果および考察】1 μM U0126 および 10 μM PD 98059 はいずれも 1 μM セロトニンによって誘起される ERK1/2 のリン酸化を抑制した。一方、1 μM セロトニン誘発性収縮を 10 μM PD 98059 が阻害したのに対して、1 μM U0126 は作用しなかった。しかし、U0126 の濃度を 10 μM まで上げると、PD 98059 と同様に収縮抑制作用が見られた。また、10 μM U0126 および PD 98059 は高濃度 KCl 誘発性収縮も同程度に抑制した。ERK5 のリン酸化に対する PD 98059 および U0126 の作用を検討した。1 μM セロトニンおよび高濃度 KCl はいずれも ERK5 のリン酸化レベルを増加させた。一方、PD 98059 と U0126 はどちらの収縮に対しても 10 μM で ERK5 のリン酸化レベルを低下させた。以上の結果より、MEK 阻害剤によるラット大動脈の収縮抑制作用は ERK1/2 ではなく、ERK5 のリン酸化の抑制と関連していることが示唆された。

## J-5 コラーゲンによる血小板濃染顆粒からの放出反応に関与する機構の動物種による相違

川島幸子<sup>1</sup>、本田直史<sup>1</sup>、伊藤勝昭<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>宮崎大・農・家畜薬理)

創傷に伴う出血を止めるにはコラーゲンによる血小板凝集が最も重要であるが、その際コラーゲンはトロンボキサン A<sub>2</sub> を産生し、かつ濃染顆粒から ADP やセロトニンを放出してこれらがコラーゲンの凝集作用を増強する。我々はコラーゲンによる血小板活性化の内因性アゴニストへの依存性には動物種差があることを既に報告した(第 131 回獣医学会)。今回は、濃染顆粒内容物の放出が動物種によって量的にどう異なるか、またその原因は放出反応に関わる機構が異なるためかを検討するため濃染顆粒に <sup>3</sup>H-セロトニン (<sup>3</sup>H-5HT) を負荷したヒト、ウシ、ラットの血小板を用いてコラーゲンによる放出反応を解析した。各動物の血小板においてコラーゲンは濃度依存性に <sup>3</sup>H-5HT 放出を上昇させたが、その効力はヒト > ラット > ウシの順であった。次にコラーゲンによる血小板活性化重要な役割を果たすと考えられるリン酸化酵素が放出にどう関与するかを検討した。ヒト血小板では PKC 阻害薬 Ro31-8220 およびホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ(PI3-K)阻害薬 LY294002 は高濃度コラーゲンによる放出反応を部分的に抑制したが、凝集は抑制しなかった。一方、ウシ血小板では Ro31-8220 と LY294002 は放出反応、凝集ともにヒト血小板より強く抑制した。両血小板で Rho キナーゼ阻害薬 Y27632 は放出に影響しなかった。以上の結果より血小板の放出反応および凝集における PKC と PI3-K の関与は動物種によって異なり、これが種差の一因となっていると考えられる。

## J-7 マクロファージ IL-1 産生における NADPH オキシダーゼ由来活性酸素種の役割

稲波修<sup>1</sup>、小野耕介<sup>1</sup>、山盛徹<sup>1</sup>、桑原幹典<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大獣医・放射線)

【はじめに】マクロファージは炎症性刺激により、IL-1 等のサイトカインを産生すると同時に、活性酸素種を生成することが知られている。本研究ではマウス RAW264 マクロファージ細胞を用いて、ゼイモサン刺激時の IL1 産生と情報伝達に対する活性酸素種の関与を明らかにするため、各種阻害剤を用いて実験を行った。

【方法】IL-1 はゼイモサン刺激した RAW264 細胞の培養液を試料とし、ELISA 法により測定した。NADPH オキシダーゼの影響を検討するために阻害剤である diphenylene iodonium(DPI)、抗酸化剤としてカテキンとタイロンを培養液に加え、IL1 産生の効果を検討した。また、SAPK/JNK 阻害剤 SP600125 を用いて、IL1 産生への影響を検討し、SAPK/JNK 活性を特異抗体を用いたウエスタンブロット法により検討した。

【結果と考察】ゼイモサン刺激による RAW264 細胞からの IL-1 産生量は、NADPH オキシダーゼ阻害剤である DPI や抗酸化剤カテキンとタイロンによって有意に抑制された。また、ゼイモサンによる活性酸素生成はこれら阻害剤で完全に抑制された。さらに、SAPK/JNK 阻害剤によっても IL-1 産生に対して有意な抑制効果が見られた。SAPK/JNK 活性化をリン酸化特異抗体を用いて検討したところ、SAPK/JNK の活性化は活性酸素種に制御されていることが示された。以上の結果から、RAW264 細胞におけるゼイモサン刺激時の IL-1 産生の情報伝達に SAPK/JNK が関与し、NADPH オキシダーゼ由来の活性酸素種によって、その活性化が制御されていることが示唆された。

## J-6 マウスにおける benzo[a]pyrene 誘発性小核形成に及ぼす 4-hydroxy furanone 化合物の二面作用

鈴木忠彦<sup>1</sup>、須田朋洋<sup>1</sup>、堤賢一<sup>2</sup>、菅原悦子<sup>3</sup>、佐藤至<sup>4</sup>、小林晴男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大・獣医薬理、<sup>2</sup>岩手大・農・寒冷バイオ、<sup>3</sup>岩手大・教育・家政教育、<sup>4</sup>岩手大・獣医公衆衛生)

醤油に特徴的な香気性 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone (HEMF)には、抗腫瘍活性があることが知られている。本研究では、タバコの変異原・発癌物質 benzo[a]pyrene (BAP)誘発性マウス赤血球小核形成に及ぼす HEMF の影響、および HEMF のラジカル捕捉能を調べた。【方法】ICR 系雄性マウス(1 群 6 匹)を用いて、BAP 誘発性小核形成に及ぼす HEMF の影響を調べた。またラジカル捕捉能の検索には安定ラジカル 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を使用した。【結果】BAP (250 mg/kg, i.p.) 投与によりマウス骨髄小核多染性赤血球数は著明に増加した。HEMF は BAP 誘発性小核形成に対して 1, 10 および 100 mg/kg, p.o. で有意(それぞれ、 $P < 0.05$ )に抑制したが、1000 mg/kg では抑制作用が見られなかった。他方、BAP を使用しない自然発生小核形成に対して 1, 10 および 100 mg/kg の HEMF は影響しなかったが、1000 mg/kg では HEMF 自身に小核形成亢進傾向が認められた。各種疾患の原因となるフリーラジカルに対する捕捉能の有無を調べる目的で、HEMF の DPPH ラジカル消去能を調べたところ、常法に従ってエタノールを溶媒に用いた場合、1 モルの HEMF は化学当量的に 1 モルの DPPH ラジカルを捕捉した。他方、エタノール+水(1:1)またはエタノール+水(1:9)を溶媒とした場合、1 モルの HEMF は 2 モルの DPPH ラジカルを捕捉することが可能であった。【結論】以上の成績から、HEMF はそれ自身が小核形成に影響を与えない低・中用量(1, 10 および 100 mg/kg)で、マウスの BAP 誘発性小核形成を特異的に抑制することが明らかにされた。また高用量(1000 mg/kg)ではそれ自身が小核形成能を有することも明らかとなった。これらの作用には、水系溶媒中で増強される HEMF のラジカル捕捉能が関与する可能性が示唆された。

## J-8 分化誘導前骨髄性白血病細胞におけるアポトーシス抵抗性

佐藤祐美子<sup>1</sup>、清宮健一<sup>1</sup>、中川博史<sup>1</sup>、松尾三郎<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・獣医・毒性)

分化誘導前骨髄性白血病細胞が示すアポトーシス抵抗性機構を明らかにするために、今回はアポトーシス抵抗性がアポトーシス発現におけるミトコンドリア経路のどの段階に関与するのかを検討した。【方法】ヒト前骨髄性白血病細胞である U937 細胞を用いた。分化誘導剤として、1 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、1 μM retinoic acid (RA) 及び 0.1 μM carbobenzoxy-leucyl-leucyl-leucinal (Z-LLL-al, プロテアソーム阻害剤)を用い、U937 へ 72 時間の前処置を行った。ミトコンドリア経路によるアポトーシス誘導剤として、1 μM の Z-LLLal を 24 時間処置した。アポトーシスの判定は Hoechst 33258 染色による核形態観察により行った。細胞分化の判定、ミトコンドリアの膜電位はフローサイトメトリーにより調べた。Caspase-3 活性は合成蛍光基質を用いて測定した。アポトーシス及び細胞分化関連タンパクの発現は Western blotting 法により、遺伝子レベルでの発現は RT-PCR 法により調べた。【結果】U937 への分化誘導剤の前処置により、単球マーカーの CD11b が発現し、単球へ分化した。また、分化細胞では、未分化細胞と比較してアポトーシス誘導剤に対して抵抗性を示し、ミトコンドリアの膜電位低下、caspase-3 活性上昇は抑制された。分化細胞と未分化細胞でアポトーシスや細胞分化に関連するタンパク発現を調べたところ、分化細胞では Bcl-2 の増加が認められ、Mcl-1 は 1 μM RA, 0.1 μM Z-LLLal 前処置で軽度な増加傾向が認められた。これらタンパクの遺伝子レベルでの発現には変化が認められなかった。【総括】分化 U937 が示すアポトーシス抵抗性にはミトコンドリア膜電位低下の抑制が関与し、Bcl-2 タンパクの増加がその一因であると示唆される。

## J-9 ハムスター大腸のプリン作動性神経 平滑筋情報伝達に対する NO 作動性神経による抑制性調節

松山勇人<sup>1</sup>、海野年弘<sup>1</sup>、小森成一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大・家畜薬理)

プリン作動性神経および NO 作動性神経は胃腸管運動を抑制的に調節している。しかし、これら神経から平滑筋への情報伝達が相互に影響を及ぼしているかどうか明らかにされていない。本研究では、NO 作動性神経がプリン作動性神経 平滑筋情報伝達を調節している可能性について検討した。実験にはハムスターから摘出した腸管片を用い、ガラス微小電極法により膜電位反応を記録した。経壁神経刺激(持続時間 500  $\mu$ sec, 強度 15 V, 単一刺激)を与えると、最初の一過性 (fast IJP) とその後の持続性成分 (slow IJP) から成る二峰性の過分極反応が誘発された。プリン受容体拮抗薬である suramin と cibacron blue 3GA は fast IJP を抑制した。しかし、slow IJP には影響を及ぼさなかった。NO 合成酵素阻害薬である L-NAME および NO 捕捉薬である OxyHb を処置すると、fast IJP は増強され、slow IJP は抑制された。神経刺激を 1 から 3 sec の間隔で 2 発加えると、2 発目の刺激による fast IJP は 1 発目の刺激による fast IJP よりも小さかった。このような IJP の減少は NO 合成酵素阻害薬あるいは NO 捕捉薬の存在下ではみられなかった。外来性に適用した NO (0.3-1  $\mu$ M) は過分極を誘発しないで fast IJP を抑制した。しかし、外来性に適用した ATP による過分極反応には影響を及ぼさなかった。3  $\mu$ M 以上の濃度の NO は膜の過分極を引き起こした。これらの結果は、ハムスター大腸において NO 作動性神経がプリン作動性神経からの ATP 放出を抑制的に調節していることを示唆している。

## J-11 マウス回腸における SK3 channel の発現

藤田秋一<sup>1</sup>、竹内正吉<sup>1</sup>、花井淳<sup>2</sup>、後藤博人<sup>1</sup>、藤波かおり<sup>1</sup>、  
未永清剛<sup>1</sup>、置塩豊<sup>1</sup>、畑文明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・農生命・獣医・応用薬理、<sup>2</sup>市立堺病院)

以前我々はラット消化管において  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  (SK) channel の SK3 が Cajal の介在細胞 (ICC) に発現していることを示唆した。今回マウス回腸での弛緩反応が SK channel の阻害薬である apamin により阻害されることを認めたので、マウス回腸での SK3 の局在部位をさらに詳しく検討した。また ICC との関わりを検討するために ICC のマーカーである c-kit 遺伝子座ミュータントマウス (W/W<sup>v</sup>, mutant) とその野生型マウス (wild) を用いて検討した。【結果】wild において回腸条片の電気刺激による縦走筋方向の弛緩、およびバルーン伸展による下行性弛緩(輪走筋方向)は apamin により抑制された。抗 SK3 抗体の陽性細胞は myenteric plexus (MY) 層及び輪走筋層内に多く見られた。また抗 c-kit 抗体との二重染色では SK3 と c-kit の陽性細胞は隣接するものの共存しなかった。mutant では c-kit 陽性の ICC-MY はほぼ完全に消失していたが、SK3 陽性細胞は消失していなかった。また神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) は SK3 陽性細胞に隣接していた。fibroblast 細胞のマーカーである prolyl 4-hydroxylase の抗体と SK3 との二重染色では両者は共存していた。さらに免疫電顕では、MY 層において SK3 陽性細胞の形態は ICC と同様に突起をもち fibroblast 細胞様の形態をし、さらに平滑筋細胞と gap junction を形成していた。【考察】以前の報告で消化管壁には ICC と同じように突起構造をもち c-kit 発現陰性の細胞 (fibroblast-like cell: FLC) が確認されており、今回の結果から SK3 は FLC に発現することが示唆された。さらに SK3 陽性細胞は nNOS を発現する神経と隣接しており、また FLC は平滑筋細胞と gap junction を形成することから、一酸化窒素がメディエイトする神経伝達経路に関与する可能性が考えられる。

## J-10 マウス回腸の伸展刺激による上行性ならびに下行性反応における Cajal の重要性

竹内正吉<sup>1</sup>、置塩豊<sup>1</sup>、藤波かおり<sup>1</sup>、藤田秋一<sup>1</sup>、畑文明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・農生命科学・応用薬理)

マウス回腸を伸展刺激の際に認められる上行性収縮と下行性弛緩における、Cajal の介在細胞 (ICC) の役割を明らかにするために、c-kit 遺伝子座ミュータントマウス (mutant) とその野生型マウス (wild) との反応を比較検討した。【方法】Mutant と wild マウスから回腸条片を採取し、特別に作成した水平のチャンバーに装着した。バルーン伸展刺激による上行性ならびに下行性反応を記録した。また、輪走筋の走行に沿った短冊標本を作成し、輪走筋の運動を記録した。各種抗体を用いて免疫染色を行った。【結果】抗 c-kit 抗体により、ICC の免疫染色を行ったところ、縦・輪走筋層内の ICC-IM および筋間神経叢内の ICC-MY は著しく減少していた。Mutant の輪走筋は wild と比較してトーンが低く、自発運動は増加していた。Wild ではバルーン伸展刺激により約 1 cm 口側に収縮が、また、約 1 cm 尾側に弛緩が生じた。口側部位の収縮反応はアトロピンにより完全に消失した。一方、下行性弛緩は一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤により抑制され、L-arginine で回復した。Mutant の回腸をバルーン伸展刺激したが、口側、尾側とも全く反応は認められなかった。しかしながら、電気刺激によりアトロピン感受性収縮と NO 合成酵素阻害剤感受性弛緩を生じた。また、回腸輪走筋標本のアセチルコリンと NO に対する反応性は両標本間で差は認められなかった。抗 nNOS 抗体を用いて調べたところ、nNOS は wild, mutant ともに神経に局在していたが、mutant でその陽性細胞が減少していた。【考察】マウス回腸では伸展刺激により口側にアセチルコリンによる収縮が、尾側には NO を介した弛緩が引き起こされる。腸神経叢に存在する ICC-MY は伸展部位から輪走筋への神経伝達に重要な役割を持つことが示唆された。

## J-12 ウグイの薬物代謝酵素 P4501A をバイオマーカーに用いた港とその周辺水域の環境汚染評価

佐治尚介<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大獣医学部毒性学教室)

【緒言】近年、合成化学物質が次々と開発、製造され、環境中にばらまかれた結果、人や野生生物は未知の有害物質に曝露されている。本研究では港とその周辺水域の環境汚染を、コイ科魚類ウグイ *Leuciscus (Tribolodon) hakonensis* の肝臓中の薬物代謝酵素 P4501A を指標として評価を試みた。P4501A は外来性化学物質を代謝する酵素で、PCB やダイオキシンなどの有機塩素化合物や多環芳香族炭化水素 (PAH) が Aryl hydrocarbon receptor (AhR) を介して酵素合成を誘導する。【方法】小樽、石狩、美国の港内でウグイをそれぞれ 20 尾採捕した。ウグイは九州から北海道、韓国、樺太などの河川や湖沼、沿岸部に生息する雑食性の魚である。小樽、石狩港は汚染水域、美国港は積丹半島の漁港で非汚染水域と仮定し、港の汚染がウグイに与える影響と、ウグイの肝臓中 P4501A のバイオマーカーとしての有効性を考察した。P4501A の酵素活性は Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性で測定した。【結果】繁殖期以外の 7 月から 10 月にかけて EROD 活性に季節変動はなかった。各水域の比較は繁殖期を避け同時期に採捕したサンプルを用いた。小樽産ウグイは石狩、美国産ウグイよりも約 2 倍の EROD 活性を示した。ブルーレーヨン吸着法による比較では、海水中 PAH 濃度は美国より小樽のほうが高かった。また美国では雄の活性が雌より約 2.5 倍高い値を示したが、石狩、小樽では性差が小さかった。性別ごとに各水域を比較すると、雄では美国と石狩産ウグイに差はなく小樽産ウグイは約 2 倍の活性を、雌では小樽、石狩産ウグイはそれぞれ美国産ウグイの約 4 倍と約 2 倍の活性を示した。このことから酵素誘導には性差があり、雌のウグイの方がより鋭敏に環境汚染に反応することが示唆された。

## J-13 マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロポルフィリン生成の制御機構 鉄による効果

中野賢司<sup>1</sup>、石塚真由美<sup>1</sup>、数坂昭夫<sup>1</sup>、藤田正一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大・獣医・毒性)

【目的】CYP1A2 を誘導したマウス肝にはウロポルフィリン(UP)が蓄積し、その量は鉄の存在によって増加することが知られている。本研究では、CYP1A2 を誘導したマウスにおいて鉄が UP の生成、蓄積に与える効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】鉄欠乏食あるいは通常食で飼育した C57BL6 マウス、および通常食以外にデキストラン鉄を腹腔に過剰投与した C57BL6 マウスの 3 群を試験動物とした。それらにメチルコラントレン (MC) (mg/kg) を腹腔内投与した。また、MC を投与せず鉄欠乏食で飼育したマウス、通常食で飼育したマウス、過剰に鉄を添加したマウスをそれぞれコントロール群とした。投与 2 日後に肝臓から S9、ミクロソームあるいはサイトソルを調製した。肝に蓄積した UP 量、S9 に含まれる CYP1A2 量 (Western Blotting 法による) および MROD 活性、ミクロソームに含まれるウロポルフィリンノーゲン酸化反応 (UROX) 酵素の活性、および、サイトソルに含まれるウロポルフィリンノーゲン脱炭酸反応 (UROD) 酵素の活性等を測定した。

【結果とまとめ】MC を投与し鉄欠乏食で飼育したマウスは、他のマウスと異なる以下の興味ある結果を示した; 1, その S9 は高い CYP1A2 発現量と高 MROD 活性を示したにも拘わらず、肝臓における UP 蓄積量は低値であった。2, そのミクロソームは高い UROX 反応性を示したにも拘わらず、サイトソルを加えると UP 生成量は減少し UROX 反応性の低下が見られた。これらの事実から、肝におけるウロポルフィリンノーゲンの酸化は、サイトソルに含まれ、鉄によって容易に阻害を受ける UROD 酵素の活性に依存することが示唆された。

## J-15 新生ラットの侵害受容反応に対する鎮痛薬の併用効果

安武寿美子<sup>1</sup>、乙黒兼一<sup>1</sup>、太田利男<sup>1</sup>、伊藤茂男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大・院・獣医・薬理)

【目的】疼痛や鎮痛の研究では、主に動物モデルを用いた in vivo 実験が行われているが、in vitro で脊髄より記録される遅い前根電位 (sVRP) は侵害反射を反映していると考えられ、痛みの指標となりうる。我々はオピオイド、2 作動薬、ケタミンの単独及び併用効果を検討するため、新生ラット摘出脊髄標本を用いて反射電位への影響を調べた。またカプサイシン誘発性体動モデルを用いて in vivo における効果を検討した。【方法】新生ラットをエーテル麻酔し、摘出脊髄標本を作製した。腰髄後根を電気刺激し、対応する前根より単シナプス反射 (MSR)、多シナプス反射 (PSR) 及び sVRP を記録した。また新生ラット背部皮下にカプサイシンを投与し、侵害刺激誘発体動を測定した。

【結果】オピオイド (モルヒネ、DPDPE) と 2 作動薬 (キシラジン、クロニジン) は MSR と PSR に影響を与えずに sVRP を濃度依存性に抑制し、この抑制はナロキソン及びアチパメゾールによってそれぞれ回復した。ケタミンは全ての反射電位を濃度依存性に抑制した。モルヒネ、ケタミン、クロニジンのうち 2 つを併用すると、sVRP は相加的に抑制された。モルヒネはカプサイシン誘発性体動を用量依存性に強く抑制したが、キシラジンの抑制効果は弱かった。両薬物の併用で相加的な抑制効果がみられた。【総括】以上の結果より、sVRP の抑制が鎮痛薬の作用を反映すること、またオピオイド、2 作動薬およびケタミンの相互作用は、新生ラットの脊髄レベルで相加的であることが示された。カプサイシン誘発性体動に対するオピオイド及び 2 作動薬の作用も相加的であることが示され、新生ラットではこれらの受容体を介する鎮痛メカニズムはそれぞれ独立していることが示唆された。

## J-14 Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

Shaban IbrahimZein<sup>1</sup>、石塚真由美<sup>1</sup>、数坂昭夫<sup>1</sup>、藤田正一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大・獣・毒性)

[Introduction] Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ) is a nuclear receptor that controls expression of genes involved in lipid metabolism and is activated by fatty acids and hypolipidemic fibrates. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediates the toxicity of TCDD and regulates expressions of several genes including CYP1A family. The aim of current study is to clarify the interaction between AhR and PPAR $\alpha$  ligands on both target gene functions. [Material and methods] We treated Wistar rats (male: 9 weeks) by Clofibric Acid (CA: 300 mg/kg/day) or Sudan III (80 mg/kg/day) as ligands to PPAR $\alpha$  or AhR respectively, or both for 4 days. We examined the levels of expressions and activities of microsomal CYP isoforms and their mRNA expressions in the liver. [Result and discussion] CA down-regulated the expression levels of AhR target genes. Sudan III decreased the protein expressions of PPAR $\alpha$  target genes such as CYP4A, either in the basal or in the induced condition. CA prevented the sudan III-induced down regulation of AhR mRNA. Our results indicate for the first time that there is an interaction between AhR and PPAR $\alpha$  ligands resulting in the down regulation of their target gene expressions.

## J-16 The effect of three pyrethroids on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats

Hossain Muhammad Mubarak<sup>1</sup>、鈴木忠彦<sup>1</sup>、佐藤至<sup>1</sup>、  
武脇義<sup>2</sup>、小林晴男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岩手大・農、<sup>2</sup>岐阜大・連合獣医)

The peripheral effects of pyrethroids on Na<sup>+</sup> channels are well reported but the CNS effects on neurotransmission are less known. The modulations of hippocampal cholinergic neurons by type I (allethrin) and II (cyhalothrin and deltamethrin) pyrethroids were studied by measuring the release of acetylcholine (ACh) in freely moving rats. The basal releases from the hippocampus of untreated rats were 65.60 pmol/10  $\mu$ l/10 min. Vehicles never affected the efflux of ACh in any of the experiment. Hippocampal microdialysis revealed that allethrin had dual, stimulatory and inhibitory effects on ACh release: Increase in ACh efflux (about 300%) in lower dose, 20 mg/kg ip, with a peak time of 60 min and decrease in the efflux (about 40%) in higher dose, 60 mg/kg ip, up to 3 hrs after administration. Cyhalothrin 20 and 60 mg/kg ip, inhibited the release (about 30%) dose-dependently, with a peak time of 50-60 min after administration. Deltamethrin 20 mg/kg ip, increased the efflux (about 250%) with a peak time of 30 min after administration and 60 mg/kg ip increased the efflux (about 450%) and remained at a steady level during the experimental period. This is the first finding, using microdialysis in vivo, that pyrethroids modulate the ACh release in the hippocampus of rat brain.

## J-17 モルモット盲腸紐におけるビンボセチンおよびEHNAの弛緩と環状ヌクレオチドの関連

金田剛治<sup>1</sup>、清水一政<sup>1</sup>、中條真二郎<sup>1</sup>、浦川紀元<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>日獣大・獣医薬理)

ホスホジエステラーゼ(PDE)は多くのアイソザイムがあり、PDEI から V 型には選択的な阻害剤が存在する。このうち PDEIII および IV 型阻害剤は cAMP を、PDEV 型阻害剤は cGMP を増加して平滑筋を弛緩させることが知られている。しかし、PDEI および II 型阻害剤は弛緩と関連する環状ヌクレオチドが臓器により異なる報告がなされている。そこで、我々はモルモット盲腸紐のカルバコール収縮に対する各種 PDE アイソザイムの収縮抑制効力を調べるとともに、PDEI 型阻害剤であるビンボセチンと II 型阻害剤である EHNA の弛緩と環状ヌクレオチドの関連について検討した。モルモット盲腸紐において、PDEI から V 型の阻害剤はいずれも濃度に依存してカルバコール(0.3 μM)収縮を抑制したが、抑制の効力はザブリナスト(V 型) > ビンボセチン(I 型) > EHNA(II 型) > ミルリノン(III 型)、Ro20-1724(IV 型)の順に大きかった。ビンボセチンは濃度に依存して組織内 cAMP 含量を増加したが、cGMP 含量には有意な影響を示さなかった。また、ビンボセチンによる弛緩と cAMP 含量の増加には高い相関が認められた。一方、EHNA は濃度に依存して組織内 cGMP 含量を増加したが、cAMP 含量には有意な影響を示さなかった。また、EHNA による弛緩と cGMP 含量の増加には高い相関が認められた。以上の結果から、モルモット盲腸紐においては PDEV 型阻害剤が最も強く収縮を抑制することが示され、また、ビンボセチンによる弛緩には cAMP が、EHNA による弛緩には cGMP が関連していることが強く示唆された。

## J-19 ブタ子宮筋 thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) 受容体の薬理学的解析

曹金山<sup>1</sup>、若月章<sup>1</sup>、北澤多喜雄<sup>1</sup>、種池哲朗<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>酪農大・獣医・薬理)

【背景と目的】TXA<sub>2</sub> はアラキドン酸から合成される prostanoid の一つであり、子宮平滑筋上の TP 受容体に作用し、PGF<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub> と共に妊娠維持、分娩誘起に重要な役割を果たしている。今回、我々は TP 受容体分布がブタ子宮筋層により異なるか否かを収縮実験及び放射性 ligand 結合実験から検討した。【方法】発情前期ブタ子宮から作製した縦走筋(LM)と輪走筋(CM)標本を 37 Krebs 液又は 28 Kumagai 液中に懸垂し、薬物による機械的応答を波形下面積と収縮高で解析した。LM、CM 膜標本に存在する TP 受容体の特徴は [<sup>3</sup>H]SQ29548 結合実験から明らかにした。【結果】1. Krebs 液中で U46619 は両筋層に TTX 非感受性の収縮を誘起した。自発収縮の面積を 100%とした時、最大反応は LM で 390%、CM で 197%、pEC<sub>50</sub> は LM で 6.7、CM で 7.3 であった。U46619 誘発性収縮は TP 受容体遮断薬、ICI-192605(PK<sub>B</sub>, 8.5)、SQ29548(8.0)により競合的に抑制された。2. U46619 は、Kumagai 液中でも子宮筋収縮を誘起した。50mM K<sup>+</sup>の収縮高を 100%とすると、最大収縮は LM で 44%、CM で 22%、pEC<sub>50</sub> は LM で 6.4、CM で 6.9 であり、収縮反応の特徴(pEC<sub>50</sub>:LM < CM, 最大反応:LM > CM)は Krebs 液下と一致していた。3. [<sup>3</sup>H]SQ29548 はいずれの筋層の膜標本においても一つの結合部位に飽和的に結合した。結合の K<sub>d</sub> 値(LM=29.6nM, CM=30.8nM)に筋層差はなかったが、B<sub>max</sub> は CM の方(90.9fmol/mg 蛋白)が LM(58.2)より約 2 倍高かった。結合阻害実験で得られた pK<sub>i</sub> 値は I-BOP > SQ29548 > CTA<sub>2</sub> > U46619 > PTA<sub>2</sub> > U44069 の順であった。【まとめ】ブタ子宮において TP 受容体は筋層依存性に存在する(CM > LM)。この分布は他の収縮性受容体(oxytocin, M<sub>3</sub>, <sub>2</sub>, ETA, FP)の分布(LM > CM)とは異なり、子宮での TXA<sub>2</sub> の役割を考える上で興味深い。

## J-18 ヒトおよびマウス子宮におけるバソプレッシンの収縮作用の種差について

斎藤みのり<sup>1</sup>、川又理樹<sup>2</sup>、木村正<sup>3</sup>、高柳友紀<sup>2</sup>、西森克彦<sup>2</sup>、柳澤肇<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東北大院・医・分子薬理、<sup>2</sup>東北大院・農・分子生物、<sup>3</sup>大阪府立成人病センター・婦人科)

オキシトシン(OT)とバソプレッシン(VP)は下垂体後葉から分泌される類縁のペプチドホルモンで、今までに1つの OT 受容体と3つの VP 受容体(V1a、V1b、V2)が報告されている。子宮平滑筋収縮にはこのうち OT 受容体と V1a 受容体が関与することが知られている。OT は妊娠子宮で大きな収縮を引き起こすことから、出産に重要であると考えられている。一方 VP の子宮における生理的役割は不明だが、局所投与が子宮筋腫核出術の出血量減少に有用であると報告されている。非妊娠マウスの子宮平滑筋において、OT および VP はともに収縮作用を示した。EC<sub>50</sub> は OT の方が低かったが、両者による最大収縮はほぼ等しかった。さらに収縮はどちらも OT 受容体阻害薬(CL-12-42)で強く抑制され、V1a 受容体遮断薬(SR49059)の作用は部分的だった。同様の結果は妊娠マウスの子宮平滑筋においても認められた。さらに RT-PCR 法で解析したところマウス子宮に V1a 受容体 mRNA の発現は認められなかった。また OT 受容体ノックアウトマウスの子宮では、OT のみならず VP による収縮反応も完全に消失していた。このため、マウス子宮平滑筋では VP は OT 受容体を介して収縮を発生させることが明らかになった。

一方、非妊娠ヒト子宮平滑筋では OT はほとんど収縮作用を示さなかったが、VP は濃度依存性に自発性収縮の頻度を増加させ、この作用は SR49059 で完全に抑制された。ヒト子宮では OT 受容体に加えて V1a 受容体の mRNA も多量に発現しているという報告があり、VP はマウスでは OT 受容体、ヒトでは V1a 受容体を介して子宮平滑筋を収縮させるものと考えられた。

## J-20 モルモット回腸平滑筋細胞の非選択的陽イオンチャネル活性化におけるフォスフォリパーゼ C の関与

岡本寛之<sup>1</sup>、海野年弘<sup>1</sup>、鈴木麻希<sup>1</sup>、松山勇人<sup>1</sup>、小森成一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>岐阜大・農・獣医薬理)

腸管平滑筋細胞には、M2 および M3 のムスカリン受容体サブタイプが存在する。M2 サブタイプは G<sub>o</sub> タイプの G 蛋白質を介して非選択的陽イオンチャネル電流(I<sub>cat</sub>)の活性化に、M3 サブタイプは G<sub>q</sub> タイプ G 蛋白質を介してフォスフォリパーゼ C (PLC)の活性化に連関している。最近、非選択的陽イオンチャネルの活性化が、M3 サブタイプに連関した情報伝達経路からのシグナルを介して促進的に調節されることが示唆されている。本研究では、I<sub>cat</sub>を調節する因子として PLC に着目し、I<sub>cat</sub>の活性化に同酵素が関与しているかどうかを明らかにしようとした。【方法】実験にはモルモット回腸縦走筋の単一細胞を用い、ホールセルパッチクランプ法により I<sub>cat</sub>を記録した。細胞外液には 120 mM Cs<sup>+</sup>溶液を、細胞内液には BAPTA-Ca バッファーで Ca<sup>2+</sup>濃度を 100 nM に固定した 124 mM Cs<sup>+</sup>溶液を用いた。【結果】(1) -50 mV の保持電位でカルバコール(1~300 μM)を累積適用すると、濃度依存性に I<sub>cat</sub>が誘発され、その最大振幅および 50%有効濃度は、それぞれ 738.8 ± 13.8 pA および 3.2 ± 0.2 μM であった。(2) PLC 阻害薬である U73122 (0.3 μM)を処置した細胞では、I<sub>cat</sub>の最大振幅は 198.4 ± 8.4 pA であり、対照細胞の場合と比較して有意に小さかった。しかし、50%有効濃度は変化しなかった。(3) U73122 の不活性類似体である U73343 (0.3 μM)は、I<sub>cat</sub>に対して抑制効果を示さなかった。以上の結果は、非選択的陽イオンチャネルの活性化に PLC が関与していることを示唆する。

## J-21 培養ブタ副腎髄質細胞の電位依存性 Ca チャネル活性に対する自己分泌/傍分泌性抑制機構

太田利男<sup>1</sup>、甲斐隆彦<sup>1</sup>、伊藤茂男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北大・院・獣医・薬理)

培養ブタ副腎髄質細胞の分泌小胞内成分による電位依存性 Ca チャネル活性に対する作用を whole-cell voltage-clamp 法により検討した。外液 Ca と Ba 存在下で保持電位 -80mV から 0mV への脱分極刺激により、それぞれ内向き Ca 電流(ICa)と Ba 電流(IBa)が生じた。外液の灌流停止により ICa は変化しなかったが、IBa は速やかに減少し、再灌流により回復した。0mV への脱分極刺激に先立ち脱分極プレパルス(+100mV、150ms)を与えると、灌流時、灌流停止時に拘わらず IBa は同程度の率で増加した。灌流停止による IBa 抑制は phentolamine 及び suramin により有意に減弱した。GDPβs の細胞内投与ならびに細胞の PTX 処置は、灌流停止、NA 及び ATP による IBa 抑制を有意に減弱させたが、proton による IBa 抑制に対しては影響を与えなかった。以上の成績より、外液 Ba 存在下では副腎髄質細胞から分泌小胞内成分の持続的な放出が起こり、灌流停止によりそれらが細胞周囲に貯留する結果、電位依存性 Ca チャネルを自己分泌/傍分泌性に抑制させることが示された。その抑制には、少なくともカテコールアミンと ATP による百日咳毒素感受性の Gi/Go 蛋白質と共役している 受容体と P2 受容体の活性化が関与していることが示唆された。

## J-23 ラット心肥大発症モデルにおけるヘパラナーゼの発現

木崎景一郎<sup>1</sup>、岡田宗善<sup>1</sup>、伊藤良一<sup>1</sup>、赤塚佳子<sup>1</sup>、百崎雅美<sup>1</sup>、吉岡一機<sup>2</sup>、藤森祐紀<sup>3</sup>、打出毅<sup>3</sup>、佐々木卓士<sup>3</sup>、天間恭介<sup>3</sup>、武藤顕一郎<sup>2</sup>、橋爪一善<sup>4</sup>、原幸男<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>北里大・獣医薬理、<sup>2</sup>北里大・獣医解剖、<sup>3</sup>北里大・毒性、<sup>4</sup>農業生物資源研・生殖再生)

【目的】ヘパラナーゼ (HPA) は細胞外マトリックス (ECM) 中のヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖を特異的に分解する酵素であり、ECM の改変に関与することから、血管新生や癌の浸潤などの面から注目されている。一方、心肥大発症時の心室リモデリングの過程においても ECM の改変が生じており、実際にマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現・活性化の関与が示唆されている。しかし、心肥大発症における HPA の関与については全く明らかにされていない。そこで今回我々は、ラット心肥大モデルの肥大心における HPA の発現について検討を行い、併せて MMP-2 の発現についても調べた。【材料と方法】Wistar 系ラットにイソプロテレノール (4 mg/kg) を 12 時間間隔で 8 回腹腔内投与し、心肥大モデルを作成した (ISO 群)。コントロール群 (C 群) には同様に生理食塩水を投与した。心肥大の評価は、心重量/体重比、左心房の ISO 誘発陽性変力作用の変化及び組織学的な検索で行った。心室における HPA 及び MMP-2 遺伝子の発現はノーザンブロット法で定量した。【結果及び考察】C 群と比べ ISO 群において心重量/体重比が 1.25 倍と有意に増加し、さらに左心房の ISO 誘発収縮反応も有意に低下した。また、組織学的にも心筋細胞の肥大傾向が認められた。心室組織における HPA mRNA の発現は C 群と比べ ISO 群において 1.8 倍に増加し、MMP-2 mRNA も同様に 2.0 倍に増加していた。以上の結果から、ISO 誘発心肥大の肥大心における HPA 発現の増加が初めて明らかとなり、心肥大発症時の心室リモデリングにおける ECM 改変に MMP のみならず HPA の関与も示唆された。

## J-22 ドキソルビシン誘発性心毒性モデルラットにおけるトロポニン (cTnI および cTnT) の有用性の検討

三枝由紀恵<sup>1</sup>、田畑肇<sup>1</sup>、古塚正幸<sup>1</sup>、花田貴宣<sup>1</sup>、岡宮英明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>山之内製薬株式会社 開発本部 安全性研究所)

【目的】トロポニン (Tn) は、骨格筋と心筋の両者において、横紋筋のアクチンとミオシンの間のカルシウムを介した筋収縮の調節を行っている。心筋細胞傷害を診断するための新しい生化学的マーカーとして心筋トロポニン I (cTnI) および心筋トロポニン T (cTnT) が注目を集めているが、実験動物でこれらの有用性の報告例は少ない。今回、ドキソルビシン (DX) 誘発性心毒性モデルラットにおいて、トロポニンの心毒性予知の有用性を、CK 等の従来の血中マーカーおよび病理組織学的結果と共に比較検証した。【方法】ラットに 3 および 9 mg/kg の DX を単回腹腔内投与し、投与後 4 および 8 時間、1, 3, 7 および 14 日のトロポニン等の筋原線維マーカーと CK 等の細胞質可溶性分画マーカーの測定を行った。また、各時点において心臓の組織切片を作成し、HE 染色および Masson trichrome 染色を施して観察した。【結果】DX 投与後 8 時間に血中 cTnI は対照群の 2~4 倍の高値を示し、CK および K では有意な上昇が認められた。投与後 3 日では cTnI は正常に復したが、CK および K の高値は持続し、9 mg/kg 投与群では ALD、LDH、GOT および GLDH が 2~5 倍の高値を示した。cTnT、ミオシン軽鎖およびミオグロビンに明らかな変動はみられなかった。病理組織学的には、びまん性的心筋変性 (心筋細胞の空胞変性および筋原線維の断片化) が 3 mg/kg 投与群の投与後 14 日に、9 mg/kg 投与群では 3 日目以降に認められた。以上の結果より、cTnI はラットにおいても組織学的な変化に先行して上昇し、心毒性予知マーカーとして有用であると考えられた。

## J-24 デキサメタゾン は血管内皮細胞へのアデノウイルスベクターによる機能障害を改善し 遺伝子導入効率をあげる

村田幸久<sup>1</sup>、堀正敏<sup>1</sup>、Li Seng<sup>2</sup>、中村彰男<sup>2</sup>、小浜一弘<sup>2</sup>、尾崎博<sup>1</sup>、唐木英明<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>東大・農学部・獣医薬理、<sup>2</sup>群馬大学・医学部・薬理)

組換えアデノウイルスは様々な血管病態をターゲットとした遺伝子導入ベクターとして最も期待されているが、in vivo での適応の際、炎症を伴った内皮細胞の機能障害が多く報告され問題となっている。我々はウサギ肺動脈組織培養標本を用い、アデノウイルス感染による血管内皮細胞機能障害機構の解析と遺伝子導入に対する免疫抑制剤 dexamethasone (DEX)、Cyclosporine A (CSA) の作用を検討した。1.5 × 10<sup>8</sup>-1.5 × 10<sup>9</sup> PFU/ml の -galactosidase adenovirus vector (-galAd) を肺動脈組織培養標本に感染させると、-gal は血管内皮細胞において濃度依存的に発現した。しかし、-galAd 感染により内皮依存性弛緩反応に障害が観察された。形態観察において 7.5 × 10<sup>8</sup> PFU/ml -galAd の感染により内皮細胞はアポトーシスを起こし、内弾性板より剥離していることが観察され、またこれらの障害は内皮細胞内のサイトカイン (IL-1、TNF、IFN) の mRNA 発現上昇を伴っていた。3 μM DEX と 3 μM CSA を -galAd 感染と同時に、さらに感染後処置すると -gal の発現量は大幅に上昇した。さらに DEX は感染によるサイトカイン発現を抑制し、内皮細胞の形態異常と機能障害を改善した。(CSA には DEX の様な作用は観察されなかった。) 以上の成績より、血管内皮細胞には細胞特異的に抗アデノウイルス感染機構が存在し、かつ遺伝子導入効率に抑制をかけていること、さらに DEX は感染による内皮障害を抑制し遺伝子導入効率を有意に上げることがわかった。