

Title	結腸紐平滑筋の膜電位と収縮に対する脱分極因子の作用について
Sub Title	Effects of some depolarizants on the membrane potential and the tension of the guinea pig taenia coli
Author	中山, 雪麿(Nakayama, Yukimaro) 尾上, 淑子( Onoe, Toshiko)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1981
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.26 (1981. ) ,p.47- 53
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	原報
Genre	Technical Report
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000026-0047">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000026-0047</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 結腸紐平滑筋の膜電位と収縮に対する脱分極因子の作用について\*

中山 雪麿, 尾上 淑子

### Effects of some depolarizants on the membrane potential and the tension of the guinea pig taenia coli

Yukimaro NAKAYAMA, Toshiko ONOE

(Received October 1, 1981)

The effects of some depolarizants, Ach, Ba and Caffeine, were investigated on the guinea pig taenia coli. Membrane potential and tension were recorded simultaneously by the sucrose gap method. Ach and Caffeine contractures in the normal Krebs solution were facilitated about 30% by their amplitudes within a certain period of Ba contracture. But, more remarkable increase of each contracture appeared at just after of Ba contracture. The absolute refractory period to Ba, or to Caffeine, occurred at just after Ach contracture, but could not be observed it to Ach repeated.

In Na free Krebs solution, muscle membrane depolarized and developed tension, that resulted a longlasting contracture, in which the membrane responded only Ach treatment. It recovered within a few minutes when the muscle came back to the normal Krebs solution. The rate of rise of Ach contracture was enhanced by Caffeine in the Na free Krebs solution, but Ba could not be replaced for it. In Na and Ca free solution, membrane also depolarized and Ach contracture declined by degrees. It suggests that the Ca store site will exist at near the surface membrane.

筋線維膜の脱分極が、収縮発現の引き金となっていることは、よく知られている生理学上の事実である。また、膜の電気現象と、収縮系の機械的現象を結ぶ、興奮-収縮連関 (Excitation-Contraction coupling ; E-C coupling) 機構の概念<sup>1)</sup>も Ca が収縮発現に不可欠の因子であるという発見<sup>2)</sup>を契機に、横紋筋の横行小管系、三連構造、そして筋小胞体と Ca 遊離機構の解明<sup>3)</sup>等多くの発見により、その機序がかなり具体的事象に置き換えられるようになった。

したがって、今日では、興奮すなわち脱分極の速さ、大きさ (spike 振巾を含む)、そして持続時間、等の膜電位の要素的变化が、収縮発現にどのような影響をおよぼすか、あるいは、脱分極がなくても収縮が起こり得るのか否か<sup>4)</sup>といった問題が、E-C coupling の機序を討議する上で、重要課題となっている。

そこで、本論文では、平滑筋における膜電位と収縮の関係を、種々の脱分極因子を用いて検討したので報告する。

### 方 法

動物は、体重約 300 g の雄性モルモットを断頭瀉血後直ちに開腹し、結腸紐 (taenia coli) を

\* 日本薬学会第 99 年会 (1979 年 8 月) で一部を発表

1) Sandow, A. (1952) *Yale J. Biol.*, **25**, 176.

2) Ebashi, S. & Endo, M., (1968) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 123.

3) Endo, M. Tanaka, M. & Ogawa, Y. (1970) *Nature*, **228**, 34.

4) Axelsson, J. (1961) *J. Physiol.* **159**, 381.

約 20 mm の長さに摘出し、97% O<sub>2</sub>+3% CO<sub>2</sub> の混合ガスを飽和させた Krebs 液中で約 2 時間 incubate した後、4°C の低温環境下に 1~4 日間保存した。そして実験に際して、適宜これを取り出し、再び 37°C Krebs 液中で 2 時間 incubate した後、実験に用いた。摘出直後の筋肉よりも低温保存筋を用いた理由は、摘出直後の筋肉に比べ、自発性活動が少なく、各脱分極因子に対する反応が、比較的安定で再現性が高いことが挙げられる。<sup>5)</sup>

膜電位、張力の導出については、しょ糖隔絶法を用い、前置増巾器と張力変換器を介して、膜電位変化と張力を同時にペン書きレクチャコーダーに誘出し記録した。

脱分極因子を作用する場合には、灌流液の流速 (2 ml/min) に合わせて各因子を適量注入し、その効果を観察する場合と、各脱分極因子が適当な濃度、溶解している灌流液を予め準備し、それら灌流液を切り換えることによって、各因子の作用を観察する場合と、二通り行った。前者の場合には、作用時間は最初の数秒間であるが、後者の場合は、作用後再び最初の液に切り換えるまで、作用時間が持続していることになる。

各脱分極因子の濃度は、Caffeine 5 mM, Ba 2.5 mM, Ach 5×10<sup>-6</sup> g/ml であった。また、Na-free 溶液は、Krebs 液中の NaCl を塩化コリンに、NaHCO<sub>3</sub> を KHCO<sub>3</sub> に置き換えた。Ca-free 溶液は、Krebs 液中の、CaCl<sub>2</sub> を除去したものである。

## 結 果

### 1) 各脱分極因子の相互作用

Ach は、作用直後に spike と、一過性の大きな脱分極を生じ、Ach 拘縮を惹き起こす。その作用濃度は 10<sup>-5</sup>~10<sup>-8</sup> g/ml と著しく低い。Ach は神経終末の化学的伝達物質の一種であることから、その方面の研究対象となっており、<sup>6)</sup> 膜に対する作用機序は、全てのイオンに対して透過性を持つようになるとされている。<sup>7)</sup>

Fig. 1 A, B, C に示された実験は、taenia coli に対する各因子の相互作用をみたもので、同図 A は、予め Ach の作用を記録した後、十分時間を置いたところで、Ba を作用させ、再び Ach を作用させ、その前後の値にどのような差を生じたかということを検討したものである。その結果、二回目の Ach 拘縮が、最初の値よりも、膜電位の変化も含めて、30% も増強していることが分かった。これは、Ba の脱分極効果が持続的であること、Ach が収縮系に対して Ba と相乗的な促進効果を与えていることなどが挙げられる。同図 B, C, も同様に、B の Caff. (5 mM) の作用にしても、Ba 作用後 2 分以内であれば、Caff. 拘縮の増強が見られるが、5 分後では、最初の値と変わらないこと、さらに、同図 C, では、Ba 作用 2 分後に Ach を作用したところ、Ach 特有の膜電位変化が消失しているにも拘わらず、Ach 拘縮は Ba 拘縮の 2 倍以上にも達していることが分かった。

以上の点から、Ba は spike を積極的に発生させる脱分極因子であると同時に、膜の興奮性を維持し、Ba 以外の因子に対しては、さらに、張力増強効果のあることが理解された。この Ba による高頻度の spike と持続性 Ba 拘縮は、膜の K conductance の増大による持続的脱分極に由来するものと考えられている。<sup>8)</sup> しかし、この現象が、Ca の存在下で観察されることから、

5) 中山雪麿 共立薬大年報 (1976) 21, 118.

6) Kitamura, K. & Kuriyama, H. (1979) J. Physiol. 293, 119.

7) Hidaka, T. & Kuriyama, H. (1969) J. gen. Physiol. 53, 471.

8) Bülbring, E. & Tomita, T. (1969) Proc. Roy. Soc. B., 172, 121.

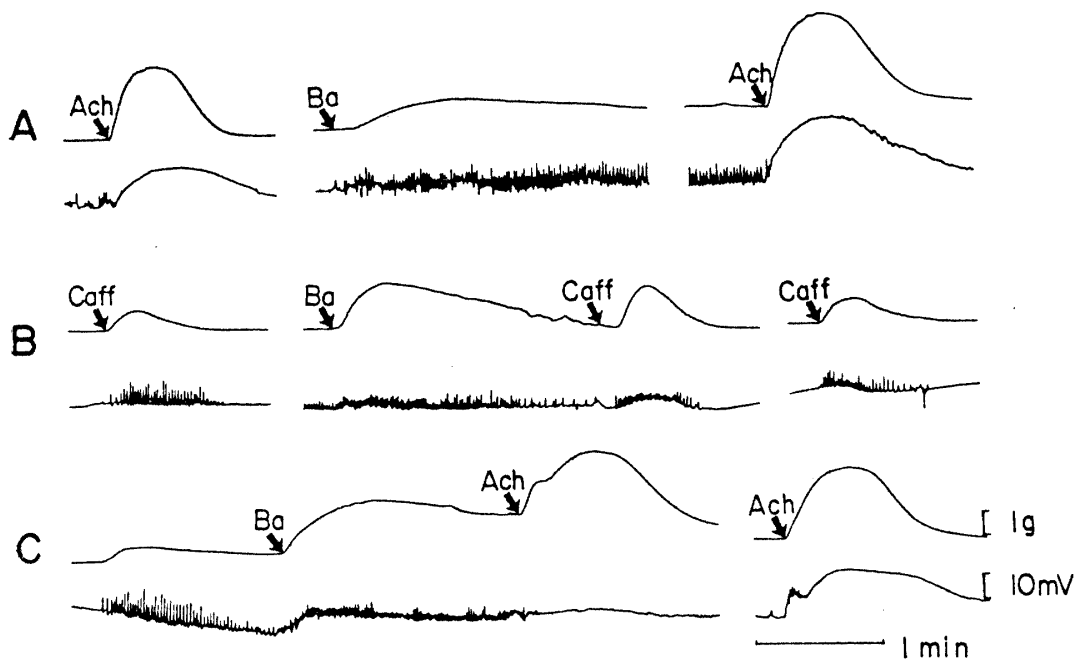


Fig. 1. Comparative effects of Ba (2.5 mM) on the membrane and contractile responses after Ach, Caffeine contracture. They were promoted by Ba treatment (A, B), but only Ach contracture was more potentiated at just after of Ba contracture, though the membrane was any changed (C).

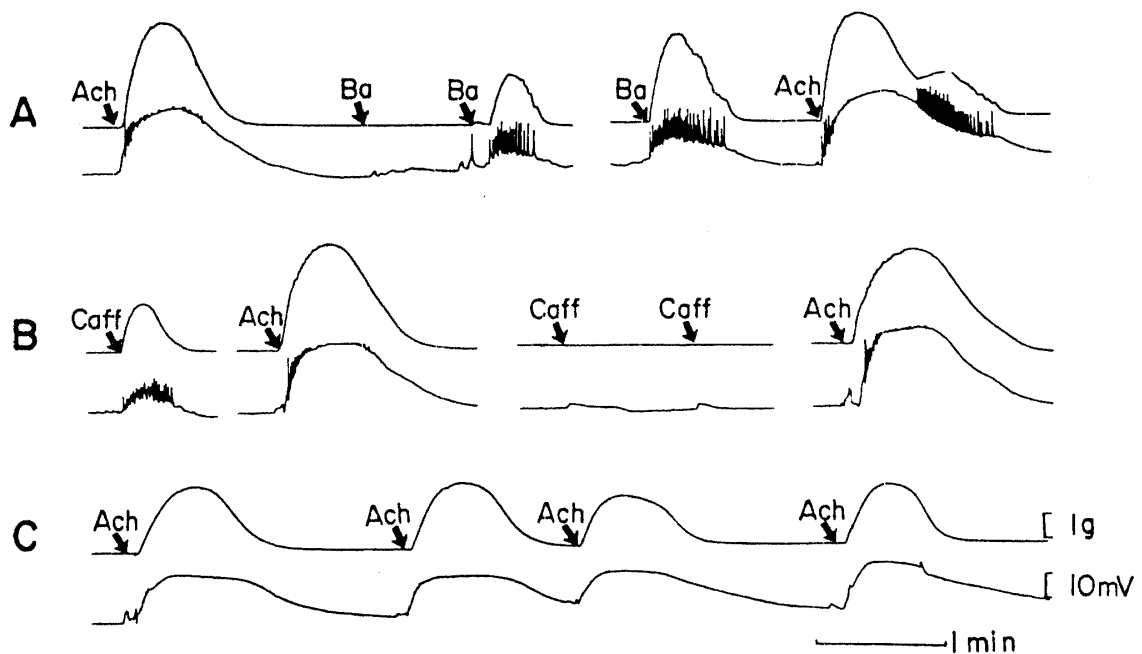


Fig. 2. Effects of Ba and Caffeine on the membrane activity and mechanical tension after Ach contracture. Absolute and relative refractory periods occurred after Ach contracture (A, B), but they abolished by Ach repeated (C). C shows the continuous recordings of membrane and mechanical activities of Ach contractures.

Ca イオンに対する透過性の変化に, Ba が間接的に影響していることが推察される。<sup>9)</sup>

次に, Ach 作用後の他の脱分極因子の作用について, 更に検討した。その結果, 膜は一時不応期に陥るということである (Fig. 2. A, B)。たとえば, Ba の場合, 膜は約 2 分間絶対不応期となり, その後徐々に Ba 拘縮が回復し, 完全な回復には, 約 10 分間を要した。そして, 再び Ach を作用したところ, 大きな Ach 拘縮が得られ, その上 Ach 拘縮後の膜電位回復期に, 高頻度の spike が観察された。この高頻度 spike を前図と合わせて考えると, 恐らく前処理した Ba の効果によるものであろう。

また Caff の場合も, 同図 B に見られるように, Ach 作用後 10 分以上も絶対不応期が続き, 本例では, 結局 13 分間も Caff 拘縮が回復しなかった。しかし, Ach 拘縮の方は, 最初の値まで完全に回復していることから, Ach または, Caff 分子が, 膜の受容体を競合することが考えられる。このことは, 同図 C にもよく現われている。すなわち, Ach 同志であれば, 興奮性に多少の差はあるものの, 連続投与によって Ach 拘縮が得られ, Ba, Caff. の場合とは明らかに膜の作用機序が異なることが推測された。

2) Na-Ca-free での脱分極因子の作用

外液の Na および Ca を除去すると, 膜が脱分極することは知られているが,<sup>10)</sup> この脱分極した膜に, さらに各脱分極因子を作用させたところ, Fig. 3, 4 のような結果を得た。

Fig. 3 に示すように, Na-free の場合, 作用直後に膜は大きく脱分極し, その上に高頻度の

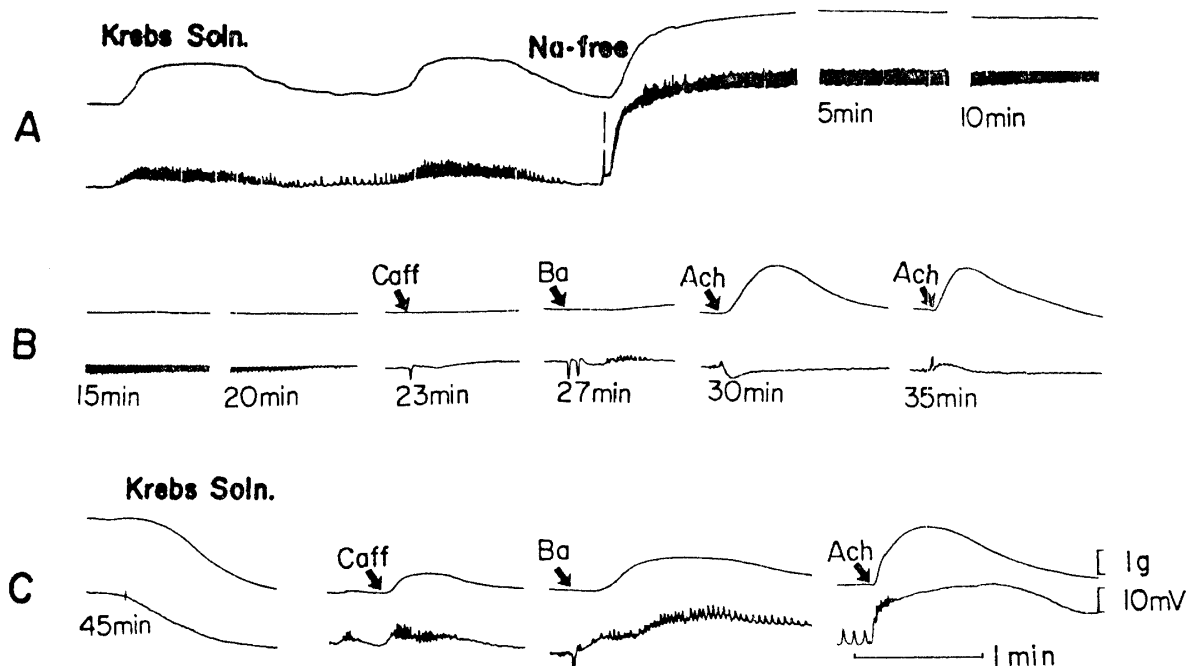


Fig. 3. Effects of Na-free Krebs solution. Depolarization and tension lasts for 45 min, and Ach contracture was obtained at 30 and 35 min. Caffeine and Ba have no responses during Na-free. All traces show the continuous recordings, and some time markers indicate the application of each factor.

9) 中山雪麿, 桜井淑子 (1978) 共立薬大年報 23, 70.

10) Brabing, A. Bülbring, E. & Tomita, T. (1969) J. Physiol. 200, 637.

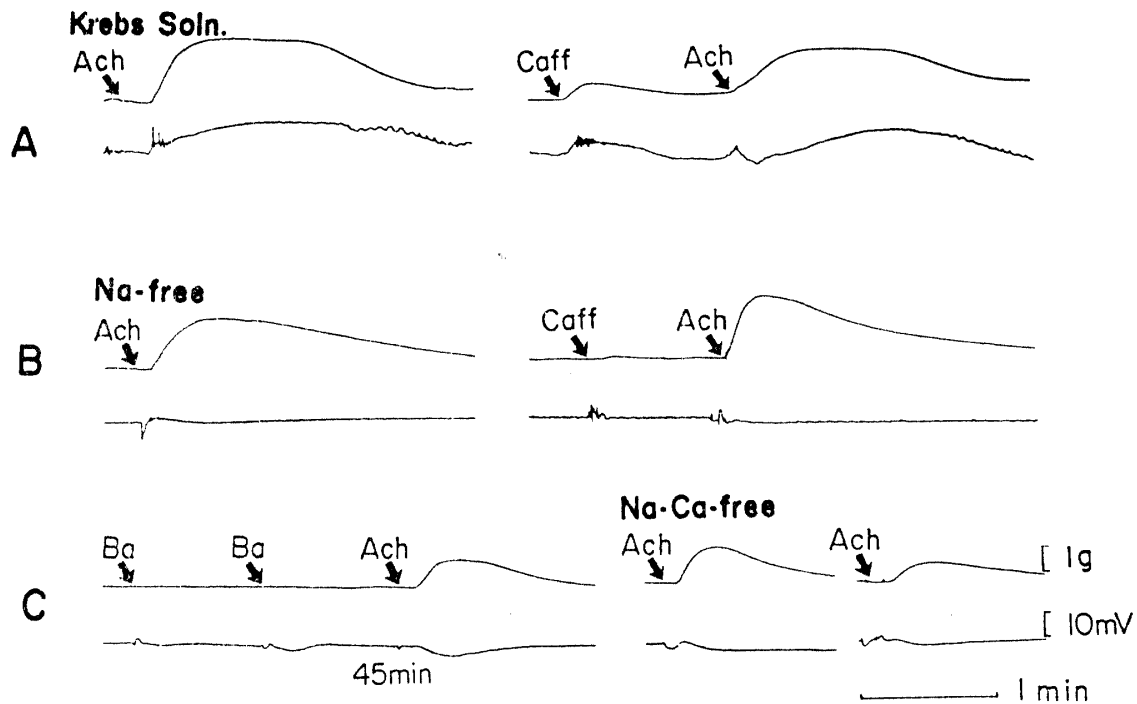


Fig. 4. Comparative effects of Ach contractures in the normal and Na free Krebs solutions. Caffeine facilitated the rate of rise of Ach contracture (A, B,) but Ba had no effect (C). In the Na-Ca free solution, Ach contracture decreased the amplitude by degrees.

spike が重なり、それに伴う持続的拘縮が発生する。この現象は、Ba 作用と類似しているが、Ba の場合には、時間の経過と共に、脱分極阻害が拘縮高を徐々に減少させるが、Na-free では、これを元の Krebs 液に戻さない限り、脱分極阻害がおこらず、拘縮は抑制されない点が異なっている。また途中で Caff や Ba を作用しても、膜は絶対不応期で、拘縮は得られないが、Ach に対してのみ、膜電位はほとんど変化せず、一過性の拘縮が発生した (Fig. 3, B)。

本例では、Na-free にしてから 45 分後に Krebs 液に戻しているが、灌流直後に膜電位ならびに拘縮高が静止値に回復している。そして、その後の各脱分極因子に対しても、ほぼ正常値に回復していることが分った (Fig. 3, C)。さらに Caff. を前に投与することによって、Ach 拘縮の立ち上り速度が著しく促進されるという結果が示されている (Fig. 4, A, B)。

一般に、平滑筋線維に、Caff. を作用すると、膜は脱分極し、しかも濃度依存性であり、低濃度の 5 mM までは、張力が増強するが、それ以上では、膜は脱分極阻害を受け、収縮は抑制される。<sup>11)</sup> しかし、本実験の場合には、Na-free 環境下で、膜が予め脱分極しているため、Caff 投与による脱分極は起こらず、その後の Ach 拘縮発生速度が増している。そして、Ca の代わりに Ba を作用したのでは、Ach 発生速度は増していない (同図 C)。

さらに、Na の他に Ca も同時に除いた液で、Ach を連続投与した場合には、その拘縮高が、回を重ねる毎に減少していることが分る。これは、明らかに細胞内貯蔵 Ca の遊離による収縮

11) Ito, Y. & Kuriyama, H., (1971) *J. gen. Physiol.* 57, 448.

で、骨格筋同様、筋小胞体に相当する Ca 貯蔵系の存在を暗示するものである。<sup>12)</sup>

## 討 論

平滑筋線維に対する、種々の脱分極因子の作用を、膜電位と収縮高の変化を指標として観察した。

結腸紐平滑筋は、本来、体内においては、腸の内圧変化に応じて伸長され、膜が脱分極し持続的強縮を惹き起こすのである。この伸長の度合が増せば、当然膜はさらに脱分極し、収縮高も増すことになる。したがって、この場合の収縮高というのは、腸内圧の増加を意味する。そして、この内圧の増加は一般に、二種類の張力変化から成り立っている。第一は、静止張力の変化で、ゆっくりと、変化の少ない、持続的脱分極（自発的 spike 頻度が増加する）により発現し、第二は、活動張力の変化で、持続的脱分極の上に重なって発生する、一過性で速やかな脱分極（自発的 spike 頻度は脱分極が大きいと減少する）により発現する。前者は、伸長の度合が増すにつれて増加するが、後者は逆に減少する。それは、活動張力が、静止張力の上に重畳する場合には、脱分極阻害をうけるからである。すなわち、活動張力の大きさから、逆に持続的脱分極の程度を予測することもできるのである。

此等の事柄は、平滑筋の興奮-収縮連関機構を考える上での重要点である。

そこで、本実験では、以上の事柄をふまえた上で、まず Ba の拘縮増強効果の有無について検討した (Fig. 1)。その結果、Ach に対しては、Ba 作用後に、拘縮高が著しく増強しており、Ach による細胞内 Ca 流入を Ba が促進したことを暗示している。その他、細胞間の興奮伝導経路の促進効果が考えられる。すなわち、平滑筋線維の膜抵抗が心筋や骨格筋に比べて大きく、<sup>13)</sup> 発生した興奮波も、限られた部位を、ゆるやかに (1~5 cm/sec) 伝播する特性を持っている。とりわけ、低温保存した標本では、E-C coupling 機構が劣化し、細胞間伝導速度は、より一層低下しているものと考えられる。さらに、Ach は神経末端に局在する、化学的伝達物質であることから、これを膜外に作用することにより、膜抵抗の減少（コンダクタンスの増加）が起こり、膜の興奮性が高まるのである。低温保存 1~4 日間の標本に対して、Ach の効果は、特に著しく現われる<sup>14)</sup> ようである。

Fig. 2. A, B は、この点をさらに明らかに示している。すなわち、Ach 拘縮の後、他の脱分極因子に対して、膜は絶対不応期に陥っている。これは、Ach の過常効果が原因と考えられるが、同図 C に見られるように、Ach 連続投与では、不応期がほぼ完全に消失していることから、Ach は外膜イオン透過性に影響をおよぼすばかりではなく、内膜といわれる、小胞体、ミトコンドリア等細胞内小器官の膜系に対しても作用し、細胞内 Ca の増加をもたらすのではないかと考えられる。<sup>15)</sup>

また、外液の Na および Ca を除去した際の、各脱分極因子の作用については、Fig. 1, 2 と同様、Ach に対する反応が、他の因子と異なっていた (Fig. 3, 4)。

すなわち、Krebs 液から Na-free 溶液に切り替えて、20 分以上経過した後、各脱分極因子を作用したところ、静止張力の上に、Ach 拘縮のみが観察されている (Fig. 3. B)。しかも、いず

12) Devine, C. E., Somlyo, A. V. & Somlyo, A. P. (1972) *J. Cell Biol.*, **52**, 690.

13) Abe, Y. & Tomita, T. (1968) *J. Physiol.* **196**, 87.

14) Shibata, S. (1969) *Circulation Res.*, **24**, 179.

15) 北沢俊雄, 小川靖男, 江橋節郎 (1973) *日薬理誌*, **69**, 113.

れの場合も、膜電位は変わらず、Ach 作用時のみ、わずかな過分極または、脱分極が起こっている。これは、Ach の平衡電位の存在を示唆すると同時に、膜電位に関与しない Ca の流入があることを暗示している。この点については、Fig. 4 にも同様の結果が示されている。同図 A, B は、Caff 作用後の Ach 拘縮を比較したものであるが、Krebs 液の場合は、むしろ拘縮が抑制されているが、Na-free 溶液中では、拘縮発生速度、拘縮高共に増加している。すなわち、Caff は脱分極膜では、Ach と相乗的に作用し、Ach 拘縮の促進に寄与しているが、Ba に対しては、全く無効であることが分った。さらに、外液の Na, Ca を同時に除いた筋でも、Ach 拘縮は徐々に減少していることから、平滑筋の収縮維持には、Ca が不可欠な因子であると同時に、細胞内 Ca の遊離によって発現し得る収縮が、かなり大きな比率を占めることも見逃せない。

また、随所に観察される、脱分極を伴わない収縮は、完全脱分極筋、グリセリン筋、そして skinned fibre 等で得られるが、いずれも、膜を取り除くか、機能を停止させるかによって得られるから、外液に Ca または、Ca と ATP を加えることによって、収縮が発生する。ところが、本実験では、生理的条件下で、Ach による脱分極なしの収縮が得られたわけで、Ach の Ca 流入または遊離促進効果は、確かに膜電位の深さに関係なく強力で、その作用機序については、今後さらに検討すべき問題を含んでいると思われる。