

The Mechanisms of Substance P-evoked Intestinal Muscle Contraction: Interaction Among Substance P, Serotonergic and Cholinergic Neurons in The Enteric Nervous System of Guinea-Pig

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8430

腸管収縮におけるサブスタンスPの作用機序に関する研究

—モルモット回腸神経叢におけるサブスタンスP, セロトニン
およびコリン作動性神経の相互作用について—

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

大 森 俊 明

(平成5年2月2日受付)

近年, 腸管の運動調節における様々な神経伝達物質の役割が解明されつつある. これらの神経伝達物質は大きくアセチルコリン, ペプチド類, アミン類に大別される. サブスタンスPとセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) はそれぞれ代表的なペプチドおよびアミン類の腸管収縮物質である. 腸管運動においてこれら2つ物質の効果発現に相互作用があると想定されているが, その詳細は未だに不明である. そこで, モルモット腸管縦走筋および輪走筋の収縮を同時に記録する方法を用いて, 腸管収縮物質であるサブスタンスP, 5-HT およびアセチルコリンの相互作用を検討した. まず, 5-HT₁受容体拮抗薬 ICS 205-930 は低濃度 (1 μ M) において選択的 5-HT₁受容体作動薬 2-methyl-5-HT (2-Me-5-HT) による両筋層の収縮を完全に遮断したが, 5-HT₂受容体作動薬 5-methoxytryptamine (5-MeOT) による腸管収縮を抑制しなかった. 一方高濃度 (10 μ M) の ICS 205-930 は両作動薬の収縮を完全に遮断した. これらの成績は, 低濃度 (1 μ M) の ICS 205-930 は選択的 5-HT₁受容体拮抗薬として作用し, 高濃度 (10 μ M) の ICS 205-930 は 5-HT₂受容体拮抗作用に加えて 5-HT₁受容体拮抗薬としての作用を合わせ持つことを示唆している. 次にサブスタンスP (1nM-1 μ M) による両筋層の収縮における ICS 205-930 (1-10 μ M) の影響を検討した. 低濃度 (1-3 μ M) の ICS 205-930 はサブスタンスP (1nM-1 μ M) による両筋層の収縮に何等影響を与えなかった. しかし, 高濃度 (10 μ M) の ICS 205-930 はサブスタンスP (1 μ M) により誘発された輪走筋の収縮を55.1 \pm 8.2%にまで選択的に抑制した ($p < 0.05$). この高濃度 (10 μ M) の ICS 205-930 による輪走筋収縮抑制作用は他のタヒキニン類 (ニューロキニン A, B) やアセチルコリンにより誘発された筋収縮においては認められなかった. また, アトロピン (10 μ M) 存在下においてサブスタンスP (1 μ M) 誘発輪走筋収縮は43.5 \pm 7.8%にまで有意に抑制されたが ($p < 0.05$), この抑制作用は高濃度の ICS 205-930 存在下における輪走筋収縮抑制 (55.1 \pm 8.2%) と同程度であり, 両者を同時に前処置した上での輪走筋収縮抑制 (40.8 \pm 7.1%) と同程度であった. さらに 5-HT (10 μ M) により誘発された輪走筋収縮活性はアトロピン (10 μ M) により12.9 \pm 7.3%にまで抑制され, テトロドトキシン (1 μ M) により完全に遮断された. これらの結果から, サブスタンスPによるモルモット回腸輪走筋の収縮の大部分は一旦セロトニン作動性神経からの 5-HT 放出を促した後, コリン作動性神経上の 5-HT₁受容体を介して筋収縮を誘発することが示唆された. しかし一部には放出されたセロトニンが他の介在神経上の 5-HT 受容体を介して筋収縮を起こす経路が存在し, また一部には直接平滑筋上のサブスタンスP受容体を介して作用する経路が存在することが示唆された. 一方サブスタンスPによる縦走筋収縮は ICS 205-930, アトロピン, テトロドトキシンいずれの影響も受けなかったことより, そのほとんどが直接縦走筋上のサブスタンスP受容体を介して直接的に筋収縮を誘発させると考えられた.

Key words 5-hydroxytryptamine, gastrointestinal motility, guinea-pig ileum, ICS 205-930, substance P

近年, 電気生理学的手法, 免疫組織化学的手法, 分子生物学的手法, 生化学的合成技術の発達によって腸管の運動調節における様々な神経伝達物質の役割が解明されつつある. これらの神経伝達物質のうち腸管収縮物質は, 古典的収縮物質のアセチルコリンのほか大きくペプチド類, アミン類に分けられる.

サブスタンスPは1957年 Euler ら¹⁾によりウマの腸管抽出物質からアトロピンでは拮抗されない平滑筋収縮物質として発見された. その後40年を経て1971年に Chang ら²⁾によってアミノ酸構造が決定され, 同年 Tragear ら³⁾によって全合成が可能となった. 本物質は11個のアミノ酸からなるペプチドホルモンで, 1983年に分離同定されたニューロキニンAおよびBととも

に哺乳類タヒキニン類に属し, 中枢および末梢神経に広く分布することが知られている. 生体内でのサブスタンスPは, 腸管収縮の他, 中枢神経系, 知覚神経, 気道収縮, 血管拡張などへ作用することが知られている⁴⁾⁻⁶⁾.

一方セロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) はモノアミン系の古典的神経伝達物質として, これもまた広く中枢および末梢神経系に分布することが知られており, 食餌中の必須アミノ酸であるトリプトファンから生体内で合成される. セロトニンは現在, 体温調節, 精神運動, 行動, 記憶, 心血管系などへの関与のほか腸管収縮物質として有名であり⁷⁾, 蠕動運動に密接に関与すると考えられている^{8,9)}. 1957年 Gaddum ら¹⁰⁾が

Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine; 5-MeOT, 5-methoxytryptamine; 2-Me-5-HT, 2-methyl-5-HT

5-HT 受容体をDおよびM受容体の2つに分類したが、後年 Bradley ら¹¹⁾は 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ の3つに分類した。最近では、様々の結合物質や阻害物質による各組織での反応の違いから、さらに多様な分類がなされている。それらの中でとくに 5-HT_{1A,1B,3,4} 受容体は腸管収縮に重要な役割を担うと報告されている¹²⁻¹⁸⁾。

ところで腸管運動は液性制御および神経性制御を受けていると考えられているが、後者はさらに交感および副交感神経による外来性神経制御と消化管壁に神経による内在性神経制御に分けられる。この内在性神経制御においてサブスタンスPとセロトニンの効果発現が相互作用を有するとの報告が多数あるが^{19,20)}、これら2つが同一神経細胞より同時に遊離して働くのか、一方は伝達物質として、他方は神経調節因子として働くのか、また後者の場合どのような受容体を介しているのかの疑問について未だ不明である。そこで著者は、モルモット腸管縦走筋および輪走筋の収縮を同時に記録する方法²⁰⁾により、サブスタンスP、セロトニンおよびアセチルコリンの相互作用を 5-HT_{3A} 受容体拮抗薬の ICS 205-930、コリン作動性神経遮断薬アトロピン、神経遮断薬テトロドトキシンを用いて検討した。

材料および方法

I. 実験動物

餌および水を自由摂取させた雄ハートレー系モルモット (300-600g) (日本エス・エル・シー、浜松) を用いた。

II. 腸管標本の作成法

雄ハートレー系モルモットを放血屠殺の後直ちに回腸を摘出し、管腔をクレブス液 (NaCl 117mM, KCl 4.7mM, CaCO₃·2H₂O 2.5mM, NaHCO₃ 25mM, NaH₂PO₄ 1.2mM, MgCl₂ 1.2mM, glucose 11mM) にて洗浄した。クレブス液存在下で腸管膜付着部に沿って切り開き、漿膜面を上にしてシリコン板に固定した後、幅2-3mm、長さ10-15mmのL字型標本を実体顕微鏡下で作成した²⁰⁾。L字型標本は消化管神経叢、粘膜、筋肉を含む消化管全層からなり、その一方は縦走筋の収縮を見るため腸管膜付着面に沿って平行になるよう、また他方は輪走筋の収縮を見るため前者と垂直になるように切開し作成した。

III. 灌流法

作成したL字型標本は10mlの灌流層に移し、流速10ml/min、37℃に加温したクレブス液にて灌流し、十分な95% O₂/5% CO₂ 混合ガスの飽和を行った。

IV. 腸管収縮の記録法

L字型標本の両筋層の交点を固定し、2つの自由端は歪増幅器 (M. C. commercial Ltd., 東京) に接続したのち、両筋層の収縮活動を等張性に記録した (図1)。実験は、シリコン板を約2時間固定した灌流槽内に、30分毎に1μMのアセチルコリン (Sigma, St. Louis, USA) を投与し一定の収縮が得られるようになったところで開始した。以下に述べる方法で薬剤を灌流槽内に直接投与し腸管収縮活動を記録した。腸管収縮活性は収縮高を測定することによって求めた。

V. 実験方法

1. 5-HT₃, 5-HT₄ 受容体作動薬により誘発された腸管収縮に対する ICS 205-930 の作用

選択的 5-HT₃ 受容体作動薬 2-methyl-5-HT (2-Me-5-HT) (Research Biochemicals Incorporated, One Strathmoreload, USA) および 5-HT₄ 受容体作動薬 5-methoxytryptamine

(5-MeOT) (Sigma) それぞれ単独投与時の両筋層の収縮活性を測定した。次に、ICS 205-930 (Sandoz, Basel, Switzerland) の前投与を行った状態での 2-Me-5-HT および 5-MeOT による両筋層の収縮活性を測定した。

2. サブスタンスPにより誘発された腸管収縮に対する ICS 205-930 および他の選択的 5-HT₃ 受容体拮抗薬の作用

異なった濃度の ICS 205-930 (1-10μM) および選択的 5-HT₃ 拮抗薬 BRL 23694 (Beecham, Harlow, UK), GR 38032F (Glaxo, Herts, UK) の前投与を行った状態でのサブスタンスP (1μM) の収縮活性を測定した。また対象実験として ICS 205-930 (1-10μM) を前投与した状態でのアセチルコリン、ニューロキニンA (ペプチド研究所、大阪)、ニューロキニンB (矢内原昇教授、静岡県立薬科大学生物薬品化学研究室) により誘発された腸管収縮活性を測定した。

3. サブスタンスPにより誘発された腸管収縮に対するアトロピンおよび ICS 205-930 の作用

サブスタンスP単独投与群、サブスタンスP + ICS 205-930 (10μM) 群、サブスタンスP + アトロピン (10μM) (Sigma) 群、サブスタンスP + ICS 205-930 (10μM) + アトロピン (10μM) 投与群の4群を設けた。サブスタンスP各濃度 (1nM-1μM) についてそれぞれ収縮活性を測定した。

4. セロトニンにより誘発された腸管収縮に対するアトロピンおよびテトロドトキシンの影響

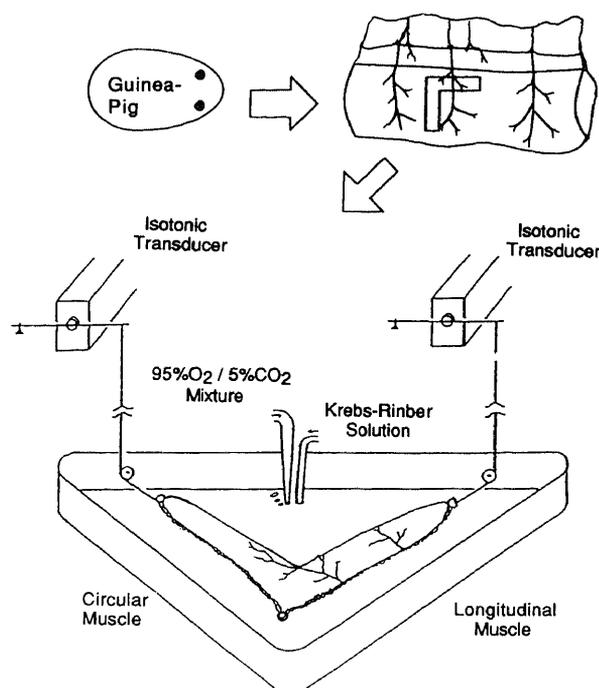


Fig. 1. The simultaneous recording system of both longitudinal and circular muscle contractions. Albino male guinea-pig (300-600g) were used for this study. After ileum was removed, L-shaped muscle strips were made. The preparations were suspended in 10 ml organ bath containing modified Krebs-Ringer solution which was kept at 37°C and bubbled with 95%O₂/5%CO₂ mixture. The junctional part of both muscle strips was fixed and the free end of each muscle was connected to a force-displacement transducer for isotonic registration of mechanical activity.

5-HT (Sigma) (10 μ M) により誘発された腸管収縮に対するアトロピン (10 μ M) およびテトロドトキシン (三共, 東京) (1 μ M) の影響を調べた. 5-HT 単独投与時の両筋層の収縮活性を測定し, 次にアトロピンまたはテトロドトキシンの前投与を行った状態での 5-HT の収縮活性を測定した.

5. サブスタンスPにより誘発された腸管収縮に対するアトロピンおよびテトロドトキシンの影響

サブスタンスPにより誘発された腸管収縮に対するアトロピン (10 μ M) およびテトロドトキシン (1 μ M) の影響を調べた. アトロピンおよびテトロドトキシンの前投与を行った状態でのサブスタンスPの収縮活性とサブスタンスP単独投与時の収縮活性を測定した.

VI. 統計処理

濃度-反応曲線および棒グラフは6ないし8匹のモルモットにより作成し, 得られたデータは平均値±標準誤差で表した. 各群間における腸管収縮活性の比較については Student's t-test を用いて統計的解析を行った. 統計学的有意差は危険率 5%未満をもって判定した.

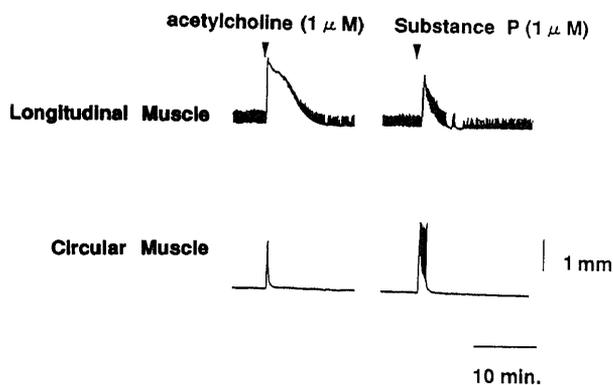


Fig. 2. The effects of acetylcholine (1 μ M) and substance P (1 μ M) on both longitudinal and circular muscle layers in guinea-pig ileum. Arrow heads indicate the time of administration of both drugs.

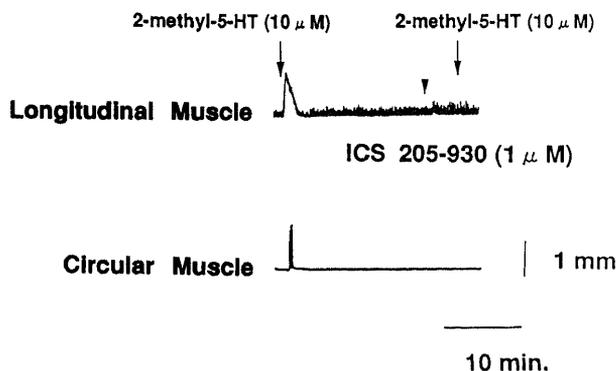


Fig. 3. The effects of selective 5-HT₃ agonist, 2-methyl-5-HT (10 μ M) on both muscle layers in guinea-pig ileum. Lower concentration of ICS 205-930 (1 μ M) completely blocked 2-methyl-5-HT-evoked muscle contractions. Arrows indicate the time of administration of 2-methyl-5-HT. Arrow head indicates the time of administration of ICS 205-930.

成 績

I. アセチルコリンおよびサブスタンスPによる両筋層の収縮

アセチルコリンまたはサブスタンスPの投与により縦走筋および輪走筋に収縮を誘発させることができる. 縦走筋のサブスタンスP (1 μ M) による収縮はアセチルコリン (1 μ M) による収縮に比べて活性が小さく, 弛緩までの時間が短い傾向にあったが, 輪走筋の収縮活性は大きく, 収縮回数は頻回傾向にあった (図2).

II. ICS 205-930 の 5-HT 拮抗薬としての作用の検討

特異的 5-HT₃ 作動薬である 2-methyl-5-HT (2-Me-5-HT) (10 μ M) は縦走, 輪走両筋層において収縮活性を示した. しかし, ICS 205-930 (1 μ M) 投与下においては, 5-HT₃ 作動薬による両筋層の収縮は完全に遮断され, 比較的低濃度 (1 μ M) の ICS 205-930 は 5-HT₃ 受容体に対して完全な拮抗作用を持つことが示された (図3).

一方 5-HT₄ 作動薬である 5-methoxytryptamine (5-MeOT) を用いて同様の実験を行った結果, 5-MeOT (10 μ M) も両筋層において収縮活性を示したが, この収縮は比較的低濃度の ICS 205-930 (1-3 μ M) 投与下によっては抑制されなかった. しかし, 10 μ M の高濃度 ICS 205-930 の前処置により収縮は完全に遮断された (図4).

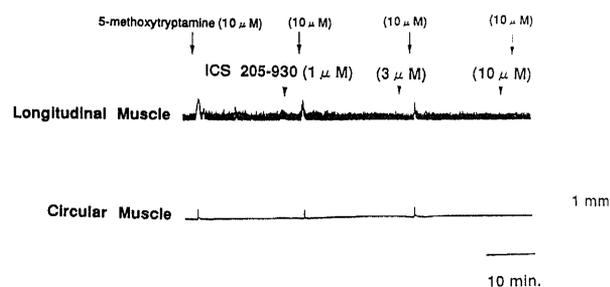


Fig. 4. The effects of 5-HT₄ agonist, 5-methoxytryptamine (10 μ M) on both muscle layers in guinea-pig ileum. 5-methoxytryptamine-evoked muscle contractions were inhibited by only higher concentration of ICS 205-930 (10 μ M). Arrows indicate the time of administration of ICS 205-930. Arrow heads indicate the time of administration of 5-methoxytryptamine.

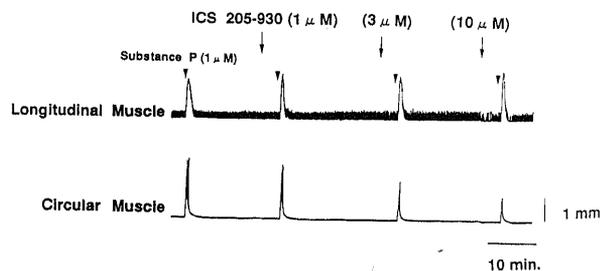


Fig. 5. The effects of ICS 205-930 on substance P-evoked muscle contractions in guinea-pig ileum. Blockade of substance P-evoked circular muscle contractions by high concentration of ICS 205-930 (10 μ M) was observed. Arrows indicate the time of administration of ICS 205-930. Arrow heads indicate the time of administration of substance P.

Ⅲ. サブスタンスPと5-HTとの相互作用の検討

1. ICS 205-930によるサブスタンスP誘発筋収縮の抑制
種々の濃度のICS 205-930前処置を施した後のサブスタンスP (1 μ M)による両筋層の収縮作用を検討した。縦走筋においては高濃度のICS 205-930投与にかかわらずサブスタンスPによる収縮活性の低下は認められなかった。一方、輪走筋においては10 μ Mの高濃度ICS 205-930の前処置によりサブスタンスP (1 μ M)により誘発された筋収縮活性の抑制が認められた(図5)。そこで、各濃度のサブスタンスPにそれぞれ異なる濃度のICS 205-930前処置を施した3群; サブスタンスP + ICS 205-930 (1 μ M)投与群, サブスタンスP + ICS 205-930 (3 μ M)投与群, サブスタンスP + ICS 205-930 (10 μ M)投与群の濃度-反応曲線をサブスタンスP単独投与群のそれと比較し図6に示した。縦走筋においてはICS 205-930濃度のいかんによらずサブスタンスP収縮活性には各群間で有意差がなかった。一方、輪走筋収縮は低濃度(1-3 μ M)のICS 205-930投与の影響を受けず、サブスタンスP単独投与群の収縮と有意差を示さなかったが、高濃度のICS 205-930 (10 μ M)投与群においてはサブスタンスP単独投与群と比較し55.1 \pm 8.2%と有意な収縮活性の低下を認めた($p < 0.05$)。

2. BRL43694, GR38032FによるサブスタンスP誘発筋収縮の抑制

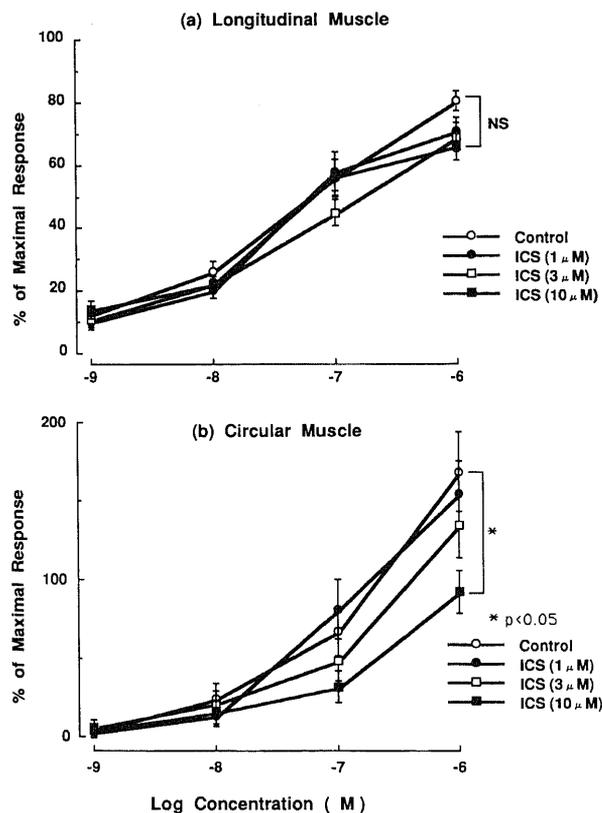


Fig. 6. The concentration-response curves of substance P in the presence of ICS 205-930 (1-10 μ M) on longitudinal (a) and circular (b) muscle. Vertical bars showed standard errors of means. Abscissa, concentration of substance P (1 μ M) in log scale; ordinate, effects expressed in % of maximal response raised by 1 μ M acetylcholine. ICS, ICS 205-930.

サブスタンスPにより誘発された縦走筋および輪走筋収縮における、ICS 205-930以外の選択的5-HT₃受容体拮抗薬^{m)}の影響を調べた。BRL43694 (=granisetron), GR38032F (=ondansetron)それぞれ10 μ M存在下にサブスタンスP (1 μ M)誘発筋収縮は両筋層において全く抑制されなかった(図7)。

Ⅳ. サブスタンスP誘発筋収縮におけるセロトニン作動性神経成分およびコリン作動性神経成分の関与

設定した4群すなわちサブスタンスP単独投与群, サブスタンスP + ICS 205-930 (10 μ M)群, サブスタンスP + アトロピン (10 μ M)群, サブスタンスP + ICS 205-930 (10 μ M) + アトロピン (10 μ M)投与群についてそれぞれ濃度-反応曲線を描いた(図8)。縦走筋においては4群の収縮活性に有意差は認められなかった。一方、輪走筋においてはサブスタンスP単独投与群

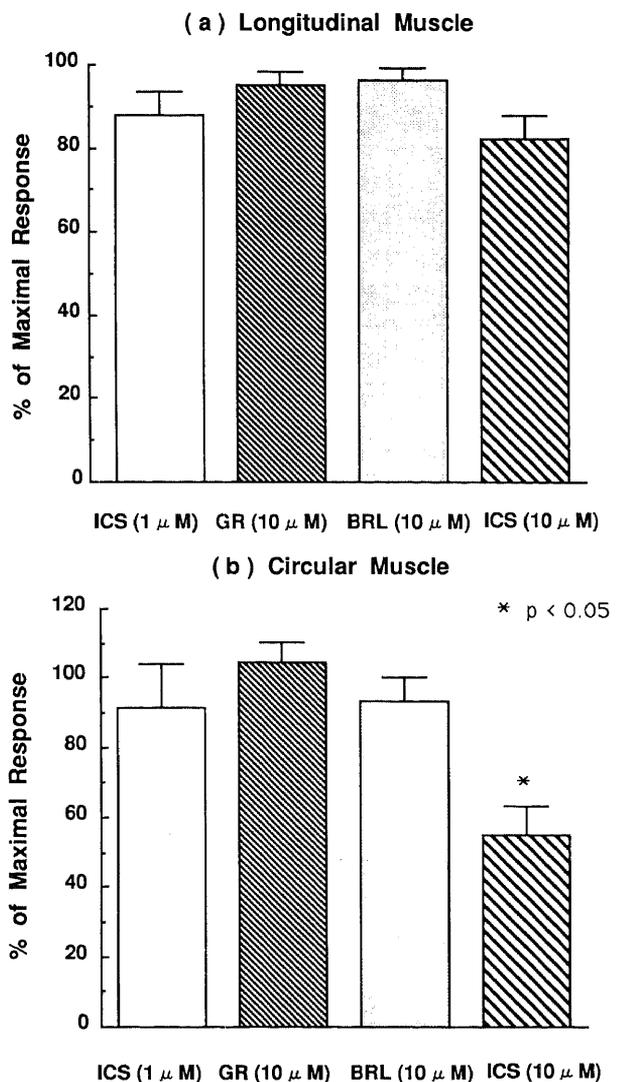


Fig. 7. The effects of 5-HT₃ antagonists (ICS 205-930, BRL43694 or GR38032F) on substance P-evoked longitudinal (a) and circular (b) muscle contractions. Substance P-evoked circular muscle contractions was significantly reduced by high concentration of ICS 205-930. Vertical bars were described as well as Fig. 6. Ordinate were expressed in % of maximal response raised by 1 μ M substance P. ICS, ICS 205-930; GR, GR38032F; BRL, BRL43694.

に比べて、他の3群で有意な収縮活性の低下がみられた。しかしこれら3群間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。

V. セロトニン誘発筋収縮におけるコリン作動性神経成分および他の介在神経成分の関与

アトロピン投与下でセロトニンによる筋収縮はセロトニン単独投与群に比べ、縦走筋で $37.5 \pm 3.7\%$ に、輪走筋で $12.9 \pm 7.3\%$ にまで有意に減弱した ($p < 0.05$)。一方テトロドトキシン投与下におけるセロトニンによる筋収縮はセロトニン単独投与時に比べ、縦走筋では $43.4 \pm 4.1\%$ へと著明な収縮活性の低下を認め、輪走筋では完全に遮断された。テトロドトキシン投与群の両筋層の収縮活性はいずれもアトロピン投与群との有意差を認めなかった (図9)。

VI. サブスタンスPによる誘発された筋収縮におけるコリン作動性神経成分および他の介在神経成分の関与

縦走筋はアトロピン ($10 \mu\text{M}$) およびテトロドトキシン ($1 \mu\text{M}$) によりほとんど抑制を受けなかったが、輪走筋ではテトロドトキシン投与群はサブスタンスP ($1 \mu\text{M}$) 単独投与群に比べて収縮活性は $27.4 \pm 7.2\%$ にまで抑制され、 $10 \mu\text{M}$ のアトロピン投与群 ($43.5 \pm 7.8\%$)、ICS 205-930 投与群 ($55.1 \pm 8.2\%$)

に比べ著しい抑制作用を示した ($p < 0.05$) (図10)。

考 察

腸管運動は交感神経および副交感神経を介した中枢の神経支配を受けているが、それとは別に腸管独自の運動調節系、いわゆる壁内神経系の調節を受けることが知られている。生体における腸管運動における中枢あるいは末梢神経からのシグナル伝達機序には、現在20種以上の神経伝達物質の存在が確認されており、多数の介在神経が関与するため極めて複雑で、その全容を解明することは困難である。しかし、腸管運動機構を明らかにするため個々の神経伝達物質が最終効果器の腸管平滑筋にどのように作用するのかを検討することは重要である。

腸管は縦走筋および輪走筋の協調作用により蠕動運動を起こ

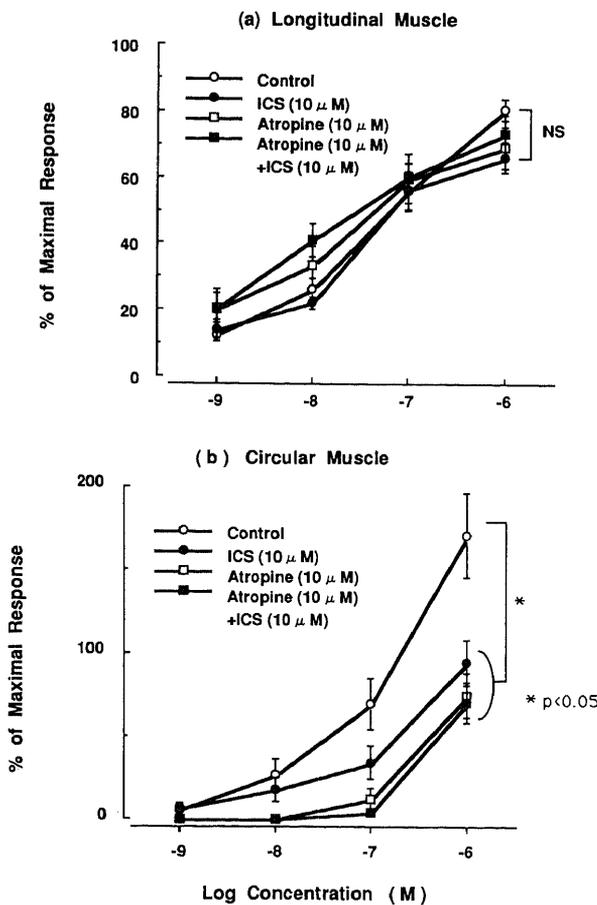


Fig. 8. The concentration-response curves of substance P in the presence of ICS 205-930 ($10 \mu\text{M}$) and/or atropine ($10 \mu\text{M}$) on longitudinal muscle (a), on circular muscle (b). Both atropine and ICS 205-930 significantly reduced substance P-evoked circular muscle contraction. But the effects of them were not additive. Vertical bars, abscissa and ordinate were described as well as Fig. 6. ICS, ICS 205-930.

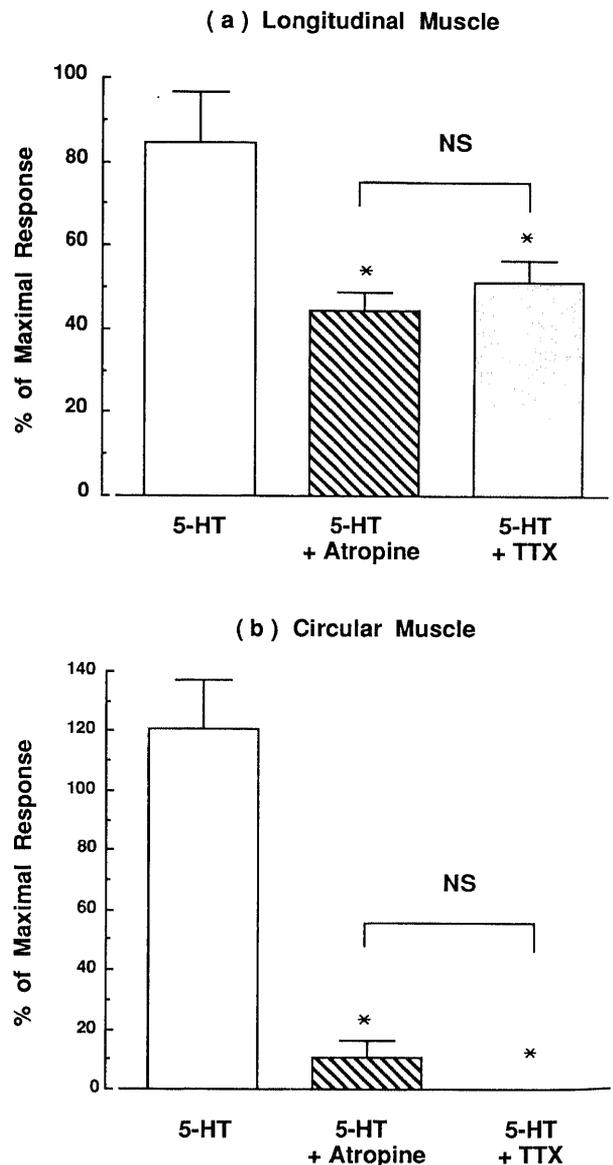


Fig. 9. The effects of atropine ($10 \mu\text{M}$) or tetrodotoxin ($1 \mu\text{M}$) on 5-HT ($10 \mu\text{M}$)-evoked muscle contractions. Both atropine and tetrodotoxin markedly reduced 5-HT-evoked contractions on both muscle layers. Vertical bars and ordinate were described as well as Fig. 6. TTX, tetrodotoxin.

すが、同一物質に対する両筋層の反応様式や収縮活性は異なる。今回著者の用いた方法は Ozaki²⁶⁾により考案されたもので、両筋層における筋収縮を同時記録することにより、各物質に対する両筋層の反応の相違点を明らかにできる点で有用であり、Kuwahara ら²⁸⁾は本法を用いてペプチドホルモンの一種であるガラニンが特異的にモルモット回腸輪走筋収縮のみ抑制することを明らかにしている。

ところで従来、腸管神経叢における3つの代表的神経伝達物質とされるサブスタンスP、セロトニンおよびアセチルコリンの相互作用については多くの説が存在する。サブスタンスPとセロトニン作動性神経の関連について Holzer ら²¹⁾は、モルモット回腸輪叢筋標本におけるサブスタンスPの収縮作用がセロトニンの脱感作作用により減弱することを観察し、サブスタンスPの作用は部分的にセロトニン作動性神経を介すると考えた。

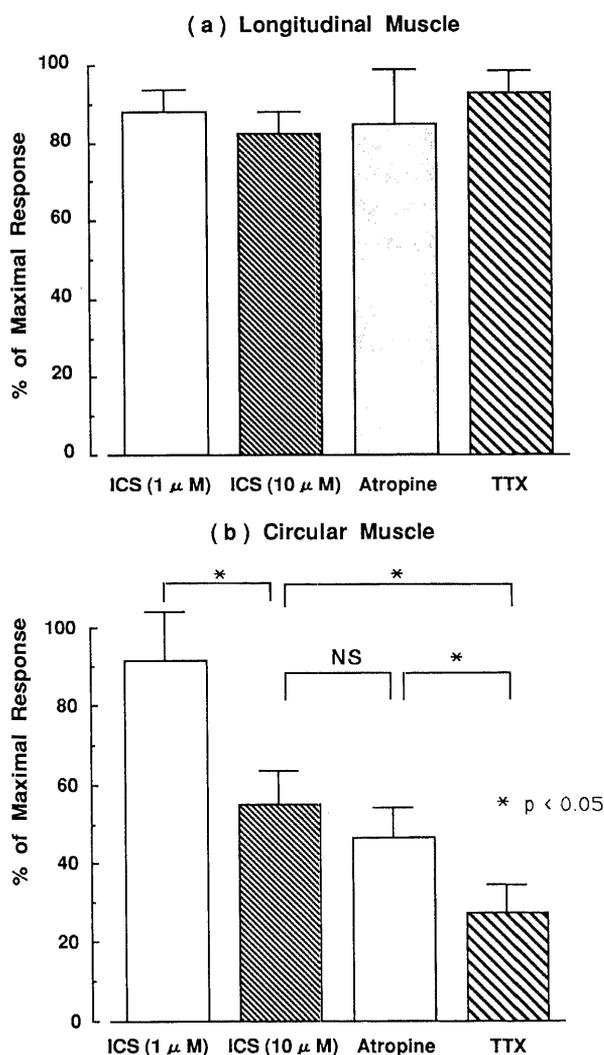


Fig. 10. The potencies of substance P (1 μ M)-evoked muscle contractions in the presence of ICS 205-930 (1–10 μ M) or atropine (10 μ M) or tetrodotoxin (1 μ M) on longitudinal muscle (a), on circular muscle (b). Tetrodotoxin did not affect substance P-evoked longitudinal muscle contraction, but markedly blocked the potency of substance P-evoked circular muscle contraction. Vertical bars and ordinate were described as well as Fig. 7. ICS, ICS 205-930; TTX, tetrodotoxin.

Holmgren ら²²⁾はニジマスの胃において、Franch ら²³⁾はラット腹側脊髄においてサブスタンスPはセロトニン作動性神経を介して作用すると報告した。また、サブスタンスP作動性神経とコリン作動性神経の相互作用について Bartho ら²⁹⁾は分離モルモット回腸平滑筋を用いた実験系で、サブスタンスPの作用がコリン作動性神経を介していることを報告した。その他セロトニン作動性神経とコリン作動性神経の相互作用についても、モルモット回腸輪走筋標本でセロトニンは5-HT₂受容体、5-HT₄受容体、あるいはそれら両方の受容体を介してコリン作動性神経を刺激するという報告^{30)~32)}がある。またサブスタンスP、セロトニンおよびコリン作動性神経の相互作用について Chahl ら⁷⁾はセロトニンはサブスタンスP神経を介してコリン作動性神経からのアセチルコリン遊離を促進させると考え、Buchheit ら¹⁸⁾はモルモット回腸縦走筋において、セロトニンは主に5-HT₂受容体を介するサブスタンスP神経刺激が直接筋に作用し、また高濃度のセロトニンは5-HT₄受容体を介するサブスタンスP神経刺激がコリン作動性神経を刺激することにより筋収縮に作用すると考えた。最近 Fox ら³⁰⁾も同様に、セロトニンの腸管収縮作用はサブスタンスP神経を介するコリン作動性神経の刺激によると報告している。しかしながら、腸管の縦走筋および輪走筋収縮におけるサブスタンスP、セロトニンおよびコリン作動性神経の相互作用についての総合的な研究は未だ行われていない。そこで著者は、コリン作動性神経遮断薬のアトロピン、神経伝達遮断薬のテトロドトキシンおよび各種の5-HT₂または5-HT₄作動薬・拮抗薬を使用し、両筋層の収縮活性の変化を測定することによって、これらの神経の相互作用について検討を行った。

まず、ICS 205-930 については最近、低濃度において選択的5-HT₂拮抗薬として働き、高濃度においては5-HT₂および5-HT₄拮抗薬として作用することが報告されている^{18)19)33)~35)}。また選択的5-HT₂作動薬2-Me-5-HTと5-HT₄作動薬5-MeOTによる反応の違いは、5-HT₂および5-HT₄受容体の判別に有用であることが報告されている²⁴⁾³²⁾³⁶⁾³⁷⁾。著者の用いた実験系では、特異的な5-HT₂受容体作動薬である2-Me-5-HTにより誘発される両筋層の収縮活動は低濃度(1 μ M)のICS 205-930により完全に遮断された。一方5-HT₄受容体作動薬である5-MeOTによる両筋層の収縮活動は低濃度(1 μ M)のICS 205-930により全く抑制を受けなかったが、高濃度(10 μ M)のICS 205-930により完全に遮断された。すなわち本実験系においても諸家の報告と同様に、低濃度(1 μ M)のICS 205-930は5-HT₂拮抗薬としての働き、高濃度(10 μ M)のICS 205-930は5-HT₂拮抗薬としての作用に加え、5-HT₄拮抗作用を合わせ持つことが明らかとなった。

次に、サブスタンスPと5-HTとの相互作用の検討では、縦走筋においてはいずれの濃度のICS 205-930前処置によっても、サブスタンスP誘発筋収縮活性の低下は認められなかった。一方、輪走筋においては、高濃度(10 μ M)のICS 205-930のみがサブスタンスP誘発筋収縮を著明に抑制した。この抑制作用は他のタキキニンであるニューロキニンA、ニューロキニンB、アセチルコリンの筋収縮活性においては認められなかったため、非特異的反応とは考え難かった。またICS 205-930以外の選択的5-HT₂受容体拮抗薬であるBRL43694 (granisetron)³⁸⁾、GR38032F (=ondansetron)³⁹⁾それぞれ10 μ M濃度の存在下において、両筋層のサブスタンスP誘発筋収縮は全く影響を受

けなかった。これらの結果より、サブスタンスPは回腸輪走筋の収縮についてのみ5-HT₄受容体の関与を受けることが示された。

また、サブスタンスP誘発筋収縮におけるセロトニンおよびコリン作動性神経成分の関与の検討において、縦走筋においては設定した4群間に有意差は認められなかった。一方、縦走筋においてはサブスタンスP単独投与群に比べ、他の3群では有意に収縮活性の低下がみられたが、これら3群間に有意差は認められなかった。これらの事実は、回腸縦走筋におけるサブスタンスP効果発現はセロトニン作動性神経、コリン作動性神経のいずれをも介さない機序による。これに反し、回腸輪走筋におけるサブスタンスP効果発現はセロトニン作動性神経、コリン作動性神経の両方を介しており、その両者が同一経路上に存在することを示唆している。

そこでさらに輪走筋についてサブスタンスP作動性神経支配下に同一経路上にあると想像されるセロトニン作動性神経とコリン作動性神経との関係、および両筋層における他の介在神経成分の関与を調べるため、コリン作動性神経遮断薬のアトロピン、神経伝達遮断薬のテトロドトキシンの投与下でセロトニン誘発筋収縮作用を調べた。縦走筋では、アトロピン存在下におけるセロトニンによる筋収縮はセロトニン単独投与群に比べ約40%にまで有意な減弱を認め、一方テトロドトキシンの投与群においてもアトロピン投与群と有意差のない収縮活性の低下を認めた。従って、縦走筋におけるセロトニンの作用はその約60%程度がコリン作動性神経を介するアセチルコリン作用によるものであり、残りの40%程度が縦走筋細胞への直接作用によるものであると考えた。また輪走筋では、アトロピン存在下におけるセロトニンによる筋収縮はセロトニン単独投与群に比べ約10%にまで著しく減弱し、テトロドトキシンの投与群においては収縮は完全に遮断された。これらの成績は輪走筋におけるセロトニンの収縮作用はすべて介在神経を介し作用することを示している。また、そのうち約90%がコリン作動性神経より遊離されたアセチルコリンの作用によって誘発され、残り10%程度の僅かな部分はコリン以外の介在神経によって誘発されると推定される。Costaら⁴⁰は免疫組織化学的手法を用いた実験で、モルモット腸管におけるセロトニン作動性神経はすべて何らかの介在神経を介して作用すると考えた。著者の実験系では輪走筋についてのみCostaらの成績を支持したが、縦走筋については筋細胞への直接作用も存在する可能性を示した。

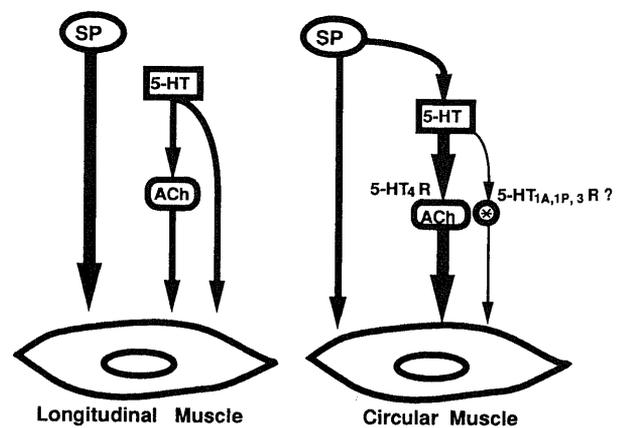
最後に、サブスタンスPにより誘発された両筋層の収縮においてもセロトニンと同様に、コリン作動性神経成分、他の介在神経成分の関与を調べ比較検討した。縦走筋収縮はアトロピンおよびテトロドトキシンの投与によりほとんど抑制を受けなかったが、輪走筋収縮では、テトロドトキシンの投与群は約30%にまで著明に抑制され、アトロピン投与群およびICS 205-930 (10 μ M)投与群に比べ有意に抑制作用が強かった。このことは、縦走筋におけるサブスタンスPの作用はそのほとんどが介在神経に依存しない経路、すなわち筋細胞上のサブスタンスP受容体との結合を介する直接作用によることを示している。また、一方の輪走筋におけるサブスタンスPの作用はその約30%が筋細胞上のサブスタンスP受容体への直接作用により誘発され、残り約70%のうち大部分はセロトニン作動性神経を介するコリン作動性神経により誘発されると推定される。

以上の著者の得た結果から推定されるサブスタンスPの作用

機序を図11に模式的に示した。従来サブスタンスPによる腸管収縮機序に関しては、直接経路のほかはコリン作動性神経系を介する経路の存在が示唆されていた。今回特に輪走筋において、高濃度のICS 205-930による5-HT₄受容体の阻害によってサブスタンスP誘発筋収縮が抑制された事実、またセロトニンの収縮活性の大部分がアトロピンにより抑制を受けた事実、あるいはアセチルコリンの収縮活性は5-HT_{3A}拮抗剤であるICS 205-930の高濃度を用いても全く減弱しなかった事実から、輪走筋におけるサブスタンスPの主たる収縮機序は、サブスタンスPがセロトニン作動性神経を興奮させ、遊離されたセロトニンが5-HT₄受容体を介してコリン作動性神経を刺激することによって生じたアセチルコリンが最終的に筋収縮を起こさせるものと想定された。Toniniら³¹もセロトニンによるモルモット回腸輪走筋の収縮は高濃度のICS 205-930によって抑制される事実から、セロトニンがコリン作動性神経上の5-HT₄受容体を介して収縮を起こすと考えており、本実験結果と矛盾しなかった。一方、縦走筋の収縮に関してBuchheitら¹⁹は、セロトニンがサブスタンスP作動性神経を刺激し、放出されたサブスタンスPが直接あるいはコリン作動性神経を介して筋収縮を起こすと考えたが、彼等の結論はセロトニン拮抗剤のサブスタンスPに対する阻害作用を観察しておらず、推測による部分が多いと考えられる。今回の実験結果から、著者はサブスタンスPによる縦走筋の収縮は筋細胞への直接作用によることを強く示唆するものとする。

結 論

1. モルモット回腸のL字型平滑筋標本を用いた実験系で、5-HT拮抗剤のICS 205-930は低濃度(1-3 μ M)においては5-HT₃受容体に対して、高濃度(10 μ M)においては5-HT₃および5-HT₄受容体に対し完全な拮抗作用を示した。
2. サブスタンスPによる輪走筋の収縮活性は高濃度(10 μ M)のICS 205-930によって有意に抑制された。
3. サブスタンスPによる縦走筋の収縮は、そのほとんど全てが縦走筋細胞上のサブスタンスP受容体を介して起こる。
4. サブスタンスPによる輪走筋の収縮機序の大部分は、セ



* Unknown Pathways

Fig. 11. Hypothesis. Substance P chiefly has direct actions on longitudinal muscle cells. Whereas on circular muscle, it has excitatory effects which are in large part, mediated by 5-HT₄ receptors located on cholinergic neurons.

ロトニン作動性神経を介在神経とし、5-HT₂受容体を介し最終的にはコリン作動性神経興奮により引き起こされる。また、一部はセロトニン作動性神経を介在神経とする5-HT_{1A}以外のセロトニン受容体を介し、他の一部は直接輪走筋上のサブスタンスP受容体刺激により誘発される。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師竹田亮祐教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導・御教示下さった国立生理学研究所の桑原厚和博士ならびに尾崎毅博士、実験に御協力頂いた国立生理学研究所技術課の佐治俊幸技官、小木曾昇技官、永田理恵子技官に心から謝意を表します。また御指導・御助言いただいた金沢大学医学部内科学第2講座の竹田康男博士、増永高晴博士、金沢大学内科学第2講座第5研究室の皆様をはじめ、教室員の皆様に深謝いたします。

尚、本研究の一部は第14回 Gut Hormone カンファレンス（静岡，1992），International symposium of substance P and related peptides（Shizuoka, 1992）において発表した。

文 献

- 1) Euler, U. S. v. & Gaddum, J. H.: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J. Physiol.* (Lond.), **72**, 74-87 (1931).
- 2) Chang, M. M., Leeman, S. E. & Niall, H. D.: Amino acid sequence of substance P. *Nature New Biol.*, **232**, 86-87 (1971).
- 3) Tregear, G., Niall, H. D., Potts, J. T., Leeman, S. E. & Chang, M. M.: Synthesis of substance P. *Nature New Biol.*, **232**, 87-89 (1971).
- 4) Erspamer, V.: The tachykinin peptides family. *Trends Neurosci.*, **4**, 267-269 (1981).
- 5) Maggio, J. E. & Mantyh, P. W.: Gut tachyins. *In* S. G. Schultz, G. M. Makhlof & B. B. Rauner (eds.), *The Gastrointestinal System, Handbook of Physiology*, vol.2, sec. 6, 1st ed., p661-697, Oxford University Press, New York, 1989.
- 6) Pernow, B.: Substance P. *Pharmacol. Rev.*, **32**, 85-141 (1989).
- 7) Chahl, L. A.: Substance P mediates atropine-sensitive response of guinea-pig ileum to serotonin. *Eur. J. Pharmacol.*, **87**, 485-489 (1983).
- 8) Dockray, G. J.: Physiology of enteric neuropeptides. *In* L. R. Johnson, J. Christensen, M. J. Jackson, E. D. Jacobson & J. H. Walsh (eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1st ed., p41-66, Raven Press, New York, 1987.
- 9) Wood, J. D.: Physiology of enteric nervous system. *In* L. R. Johnson, J. Christensen, M. J. Jackson, E. D. Jacobson & J. H. Walsh (eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1st ed., p67-110, Raven Press, New York, 1987.
- 10) Gaddum, J. H. & Picarelli, Z. P.: Two kinds of tryptamine receptor. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **12**, 323-328 (1957).
- 11) Bradley, P. B., Engel, G., Feniuk, W., Fozard, K. R., Humphrey, P. P. A., Middlemiss, D. N., Mylecharane, E. J., Richardson, B. P. & Saxena, P. R.: Proposals for the classification and nomenclature of functional receptor for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology.*, **25**, 563-576 (1986).
- 12) Galligan, J. J.: Differential inhibition of cholinergic and noncholinergic neurogenic contractions by 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor agonists in guinea pig ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **260**, 306-312 (1992).
- 13) Kaumann, A. J., Sanders, L., Brown, A. M., Murray, K. J. & Brown, M. J.: A 5-hydroxytryptamine receptor in human atrium. *Br. J. Pharmacol.*, **100**, 879 (1990).
- 14) Sanger, G. J. & King, F. D.: From metoclopramide to selective gut motility stimulants and 5-HT₂ receptor. *Drug Des. Deliv.*, **3**, 273-295 (1988).
- 15) Nemeth, P. R., Ort, C. A., Zafirov, A. H. & Wood, J. D.: Interactions between serotonin and cisapride on myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **108**, 77 (1985).
- 16) Mawe, G. M., Branchek, T. A. & Gershon, M. D.: Peripheral neural serotonin receptors: Identification and characterization with specific antagonists and agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9799-9803 (1986).
- 17) Nemeth, P. R. & Gullikson, G. W.: Gastrointestinal motility stimulating drugs and 5-HT receptors on myenteric neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, **166**, 387-391 (1985).
- 18) Richardson, B. P., Engel, G., Donatsch, P. & Stadler, P. A.: Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature*, **316**, 126-131 (1985).
- 19) Buchheit, K. H., Engel, G., Mutschler, E. & Richardson, B.: Study of the contractile effect of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the isolated longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. pharmacol.*, **329**, 36-41 (1985).
- 20) Fox, A. J. & Norton, I. K. M.: An examination of the proposed functional interaction of substance P and 5-HT in the guinea pig ileum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **632**, 385-388 (1991).
- 21) Holzer, P., Lembeck, F. & Donnerer, J.: Caerulein, Substance P, serotonin and cholinomimetics induce rhythmic contractions of the intestinal circular muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. pharmacol.*, **312**, 131-137 (1980).
- 22) Holmgren, S., Grove, D. J. & Nilsson, S.: Substance P acts by releasing 5-hydroxytryptamine from enteric neurons in the stomach of the rainbow trout, *Salmo Gairdneri*. *Neuroscience*, **14**, 683-693 (1985).
- 23) Franch, J., Fried, G. & Brodin, E.: Substance P enhances the release of endogenous serotonin from rat ventral spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.*, **174**, 85-90 (1989).
- 24) Craig, D. A., Eglon, R. M., Walsh, L. K. M., Perkins, L. A., Whiting, R. L. & Clarke, D. E.: 5-Methoxytryptamine and 2-methyl-5-hydroxytryptamine-induced desensitization as a discriminative tool for the 5-HT₂ and putative 5-HT₁ receptors in guinea pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **342**, 9-16 (1990).
- 25) Reisine, T., Soubrie, P., Artaud, F. & Glowinski, J.: Application of L-glutamic acid and substance P to the substance nigra modulates *in vivo* (³H) serotonin release in

- the basal ganglia of the cat. *Brain Res.*, **236**, 317-327 (1982).
- 26) **Ozaki, T.**: Effects of stimulation of Auerbach's plexus. *Jpn. J. Physiol.*, **29**, 195-209 (1979).
- 27) **Turconi, M., Donetti, A., Schiavone, A., Sagrada, A., Montagra, E., Nicola, M.; Cesana, R., Rizzi, C. A. & Micheletti, R.**: Pharmacological potencies of novel class of 5-HT₃ receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.*, **203**, 203-211 (1991).
- 28) **Kuwahara, A., Ozaki, T. & Yanaihara, N.**: Galanin suppresses neurally evoked contractions of circular muscle in the guinea pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.*, **164**, 175-178 (1989).
- 29) **Bartho, L. & Holtzer, P.**: Search for a physiological role of substance P in gastrointestinal motility. *Neuroscience*, **16**, 1-32 (1985).
- 30) **Fox, A. J. & Morton, I. K. M.**: An examination of the proposed functional interaction of substance P and 5-HT in the guinea pig ileum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **632**, 385-388 (1991).
- 31) **Tonini, M., Candura, S. M., Onori, L., Cocconi, T., Manzo, L. & Rizzi, C. A.**: 5-hydroxytryptamine₂ receptor agonists facilitate cholinergic transmission in the circular muscle of guinea-pig ileum.: antagonism by tropisetron and DAU 6285. *Life Sci.*, **50**, 173-178 (1992).
- 32) **Kilbinger, H. & Wolf, D.**: Effect of 5-HT₄ receptor stimulation on basal and electrically evoked release of acetylcholine from guinea pig myenteric plexus. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **345**, 270-275 (1992).
- 33) **Clarke, D. E., Craig, D. A. & Fozard, J. R.**: The 5-HT₁ receptor: Naughty, but nice. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 385-386 (1989).
- 34) **Craig, D. A. & Clarke, D. E.**: 5-hydroxytryptamine and cholinergic mechanisms in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.*, **96**, 247 (1989).
- 35) **Tonini, M., Galligan, J. J. & North, R. A.**: Effects of cisapride on cholinergic neurotransmission and propulsive motility in the guinea-pig ileum. *Gastroenterology.*, **96**, 1257 (1989).
- 36) **Craig, D. A. & Clarke, D. E.**: Pharmacological characterization of a neural receptor for 5-hydroxytryptamine in guinea pig ileum with properties similar to the 5-hydroxytryptamine₂ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **252**, 1378-1386 (1990).
- 37) **Fozard, J. R.**: 5-methoxytryptamine (5-MeOT) discriminates between excitatory neuronal 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in the guinea-pig ileum. *J. Pharmacol. (Paris)*, **16**, 498 (1985).
- 38) **Sanger, G. J. & Nelson, D. R.**: Selective and functional 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonism by BRL 43694 (granisetron). *Eur. J. Pharmacol.*, **159**, 113-124 (1989).
- 39) **Butler, A., Hill, J. M., Ireland, S. J., Jordan, C. C. & Tyers, M. B.**: Pharmacological properties of GR38032F, a novel antagonist at 5-HT₃ receptors. *Br. J. Pharmacol.*, **94**, 397-412 (1988).
- 40) **Costa, M., Furness, J. B. & Llewellyn-Smith, I. J.**: Histochemistry of the enteric nervous system. *In* L. R. Johnson, J. Christensen, M. J. Jackson, E. D. Jacobson & J. H. Walsh (eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 1st ed., p1-40, Raven Press, New York, 1987.

The Mechanisms of Substance P-evoked Intestinal Muscle Contraction: Interaction Among Substance P, Serotonergic and Cholinergic Neurons in The Enteric Nervous System of Guinea-Pig Toshiaki Ohmori, Department of Internal Medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102**, 190—199 (1993)

Key words 5-hydroxytryptamine, gastrointestinal motility, guinea-pig ileum, ICS 205-930, substance P

Abstract

Gastrointestinal motility is controlled by many neuropeptides and amines in the enteric nervous system. Both substance P and 5-hydroxytryptamine (5-HT) have been considered as the most important excitatory neurotransmitters. These substances might interact with each other in modifying gastrointestinal motility. We examined this possibility in guinea-pig ileum using the 5-HT₃ receptor antagonist, ICS 205-930, which acts as a 5-HT₄ antagonist only at high concentrations, in addition to its role as a 5-HT₃ antagonist. The effects on substance P-induced muscle contractions were studied by simultaneous recording technique from longitudinal and circular muscle strips of the guinea-pig ileum. First, substance P dose-dependently induced phasic contractions on both muscle strips. Lower concentrations of ICS 205-930 (1–3 μ M) did not affect the substance P-induced muscle contractions in either muscle strip. However, a higher concentration of ICS 205-930 (10 μ M) significantly reduced only the substance P (1 μ M)-induced circular muscle contractions to 55.1 \pm 8.2% of the control. On the other hand, no concentration of ICS 205-930 affected longitudinal muscle contractions. ICS 205-930 did not affect acetylcholine (1 μ M), neurokinin A (1 μ M) or neurokinin B (1 μ M)-induced contractions of either muscle. Next, to investigate the interaction between cholinergic and serotonergic neurons, atropine (10 μ M) and/or ICS 205-930 (10 μ M) treated substance P-induced contractions of both muscles were tested. Atropine also significantly reduced only substance P-induced circular muscle contractions to the same extent as ICS 205-930, but the effects of atropine and ICS 205-930 were not additive. Finally, the neural synaptic blocker, tetrodotoxin (1 μ M) was tested on substance P or 5-HT-induced contractions of both muscles. Tetrodotoxin markedly reduced substance P-induced circular muscle contractions, but did not affect longitudinal muscle contractions at all. 5-HT-induced circular muscle contractions were completely blocked by tetrodotoxin, while longitudinal muscle contractions were not. These results suggest that substance P has direct actions on longitudinal muscle cells in guinea-pig ileum. In addition, substance P-induced circular muscle contractions were largely mediated by 5-HT₄ receptors located on cholinergic neurons.