

Ethanol のラット膀胱平滑筋弛緩作用に関する研究

—初代培養ラット膀胱平滑筋細胞を用いた解析—

城谷 建二

Ethanol が膀胱平滑筋を弛緩させる可能性が示唆されていることから、本研究ではラット膀胱平滑筋条および初代培養ラット膀胱平滑筋細胞を用い、ethanol の KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす影響を検討することにより、ethanol の膀胱平滑筋収縮抑制作用の発現機序について検討を行った。KCl は濃度依存性に膀胱平滑筋条を収縮させ、この収縮は ethanol および verapamil により有意に阻害された。これらの両薬物の同時存在下における膀胱平滑筋収縮の阻害の程度は、これらの薬物の単独存在下でみられた収縮阻害の程度と同一であった。

KCl は膀胱底部より調製した平滑筋細胞への $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を濃度依存性および incubation 時間依存性に増加させた。KCl (50 mM) 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は細胞膜脱分極阻害薬である tetrodotoxin、および細胞膜安定化薬である dibucaine と procainamide、および電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である verapamil により濃度依存性に抑制された。また、10 mM verapamil はこの $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を完全に消失させた。ethanol は KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を濃度依存性に抑制し、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化薬である Bay k-8644 により誘発される $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入も完全に抑制した。ethanol による KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入抑制は、膀胱頂部および底部より調製した平滑筋細胞のいずれにおいても認められ、流入抑制作用の程度に差違は認められなかった。以上の実験成績から、ethanol による KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮の抑制は、ethanol が平滑筋細胞膜の脱分極により誘発される電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制することにより発現されることが明らかとなった。

(平成11年5月24日受理)

Mechanisms for Inhibitory Action of Ethanol on Contraction of Rat Bladder Smooth Muscle — Analysis Using Rat Bladder Smooth Muscle Cells in Primary Culture —

Kenji SHIROTANI

Mechanisms for the inhibitory action of ethanol on urinary bladder smooth muscle were investigated using bladder smooth muscle strips and smooth muscle cells in primary culture. KCl (126 mM)-induced contraction of the smooth muscle strips was dose-dependently inhibited by ethanol and verapamil, an inhibitor specific to L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs), and simultaneous addition of these two agents had neither additive nor synergic effects on the KCl-induced contraction. KCl increased $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into rat bladder muscle cells in a dose-

dependent manner with maximal stimulation at 50 mM. This stimulatory effect of 50 mM KCl was dose-dependently suppressed by tetrodotoxin, a membrane depolarization inhibitor, and membrane-stabilizing drugs such as dibucaine and procainamide. The influx was completely abolished when these drugs showed their maximal effects. These results indicate that the KCl-evoked [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] influx into bladder smooth muscle cells is mediated via activation of L-type VDCCs subsequent to membrane depolarization. Ethanol also reduced the KCl-induced [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] influx in a dose-dependent manner to the basal level of influx. In addition, [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] influx induced by Bay k 8644, an activator of L-type VDCCs, was completely suppressed by ethanol. These results indicate that ethanol induced relaxation of bladder smooth muscle via its inhibitory action on Ca^{2+} entry into smooth muscle cells which was induced by activation of L-type VDCCs.

(Accepted on May 24, 1999) *Kawasaki Igakkaishi* 25(2): 77-86, 1999

Key Words ① Bladder smooth muscle ② Ethanol ③ Ca^{2+} influx
④ Voltage-dependent Ca^{2+} channels
⑤ Primary culture of rat bladder smooth muscle cells

緒 言

飲酒により排尿障害を来すことは従来よりよく知られている^{1),2)}. この排尿障害は前立腺の浮腫・血流増加に伴う下部尿路閉塞および ethanol の利尿作用による膀胱過伸展などが原因となっている可能性が多くの研究から示唆されている^{1),2)}.

一方、最近の研究から、ethanol が血管、胆嚢などの平滑筋を直接的に弛緩させる作用を有していることが報告されている^{3)~5)}. また、膀胱においても ethanol が膀胱平滑筋弛緩作用を有する可能性が示唆されている. さらに Yokoi ら⁶⁾ は ethanol がラット膀胱平滑筋に対し直接的な弛緩作用を示すことを明らかにしている. しかしながら、ethanol の平滑筋弛緩作用の発現機序については十分に解明されていないのが現状である.

本研究では、ラット膀胱平滑筋条に及ぼす ethanol の影響を検討するとともに、初代培養ラット膀胱平滑筋細胞を用い、平滑筋細胞への Ca^{2+} 流入に及ぼす ethanol の作用を [$^{45}\text{Ca}^{2+}$] 流入を測定することにより検討を行い、ethanol の膀胱平滑筋弛緩作用の発現機序の解明を試みた.

実験材料および実験方法

1) ラット膀胱平滑筋条の作製および平滑筋条に及ぼす ethanol の作用の検討

ラット膀胱平滑筋条の作製は以下の通りに行った. すなわち、雄性 Sprague-Dawley ラット(体重: 200~250 g)を断頭により失血死させたのち、Tyrode 液 (136.9 mM NaCl, 0.33 mM NaH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 1.05 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11.9 mM NaHCO_3 , 5.9 mM glucose, 1.8 mM CaCl_2 , pH 7.4) 中で膀胱周囲組織を十分に除去し、 $2 \times 10 \times 2$ mm の平滑筋条を作製した.

ラット膀胱平滑筋条に及ぼす ethanol の作用の検討は Magnus 法による平滑筋収縮の測定を観察することにより行った. すなわち、膀胱平滑筋条の一端を 10 ml の Tyrode 液を含む organ bath 中のセルフインに懸垂固定し、他端を isotonic transducer (日本光電社製: JD-112 S) に接続し、膀胱平滑筋の収縮の変化を観察した. Organ bath 中の Tyrode 液は 37°C に保持し、常時 95% O_2 / 5% CO_2 を通気することにより酸素を供給した. 実験15分前に諸種の濃度の ethanol および verapamil を含む Tyrode 液に変更し、126 mM KCl をもちいて膀胱平滑筋条の刺激を行い、それぞれの濃度の ethanol および

verapamil による収縮量を、これら薬物の非存在下で観察された膀胱平滑筋条の収縮量を対照として、収縮抑制率を算出した。

2) ラット膀胱平滑筋細胞の単離および初代培養

ラット膀胱平滑筋細胞の単離および初代培養は、馬ら⁷⁾の報告したヒト膀胱平滑筋細胞の単離法および初代培養法に準じて行った。すなわち、雄性 Sprague-Dawley ラット (体重: 200~250 g) を断頭失血死させたのち、腹部正中切開にて膀胱を摘出し、RPMI 1640培養液 (pH 7.4) 中で速やかに膀胱周囲組織ならびに粘膜を除去した。尿管口を指標に膀胱を頂部側および底部側に分離し、ついで0.2% trypsin を含有する RPMI 1640培養液、および0.1% collagenase 含有 RPMI 1640培養液中でそれぞれ37℃, 30分の酵素処理を行った。酵素処理後、遠心分離 (250 × g, 5 分, 4℃) を行い、得られた沈渣を10% ウシ胎児血清 (FCS) 含有 RPMI 1640培養液に懸濁させ、上述と同様の条件で遠心分離を行った。この遠心分離による洗浄を2回行い、最終的に得られた沈渣を10% FCS 含有 RPMI 1640培養液で懸濁し、Falcon 社製の disposable culture dish に播種した。4日毎に培養液を新鮮な10% FCS 含有 RPMI 1640培養液に交換し、細胞が⁸⁾ confluence に達した時点 (約10日) で実験に供した (Fig. 1A)。これらの細胞の光顕像はすでに報告されている形態と一致すると考えられる⁷⁾。また、培養細胞がラット膀胱平滑筋であることを確認するために、抗ラットミオシン抗体を用いて、免疫染色を行ったところ、すべての細胞が抗ラットミオシン抗体に陽性を示したことから、これらの細胞は膀胱平滑筋であると判定した (Fig. 1B)。

3) [⁴⁵Ca²⁺] 流入の測定

初代培養ラット膀胱平滑筋細胞への [⁴⁵Ca²⁺] 流入の測定は、Ohkuma⁸⁾らの方法を一部変更して行った。すなわち、膀胱平滑筋細胞を20 mM HEPES を含有する Ca²⁺-free Krebs-Ringer bicarbonate buffer (KRB-H: 137 mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄ ·

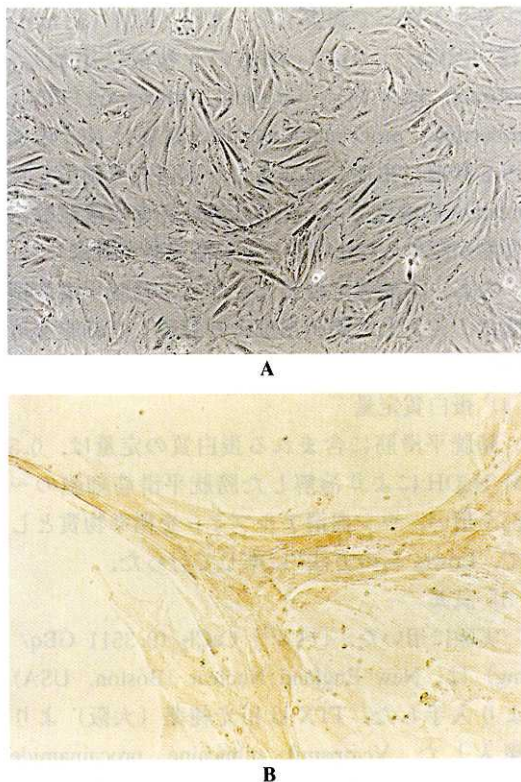


Fig. 1. Rat bladder smooth muscle cells in primary culture. (A) Phase contrast microphotographs. Cells have morphological characteristics with so-called "hills and valley" pattern (×200). (B) Phase contrast microphotographs after immunohistochemical staining with rat anti-myosin antibody (×400).

6 H₂O, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 20 mM HEPES, pH 7.4) 中で37℃, 10分間の preincubation を行ったのち、incubation buffer を新鮮な Ca²⁺-free KRB-H (37℃) に変更し、1.26 mM [⁴⁵Ca²⁺] CaCl₂ (1.0 μCi [⁴⁵Ca²⁺] CaCl₂/dish) を incubation buffer 中に添加することにより反応を開始した。2分間の反応ののちに、[⁴⁵Ca²⁺] CaCl₂ を含む incubation buffer を吸引除去し、直ちに氷冷した KRB-H で培養皿を5回洗浄 (計7.5 ml) することにより反応を停止させた。反応停止後、0.5 M NaOH とともに膀胱平滑筋細胞を培養皿より剥離し、その一部をシンチレーションバイアルに移し、0.5 M 酢酸で中和したのち、シンチレーターを加え、膀胱平滑筋細胞内に流入した [⁴⁵Ca²⁺] の放射活性を液体シンチレーショ

ンカウンターで測定した。また, KCl (50 mM) は $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ CaCl_2 添加の 5 秒前に添加し, ethanol, Bay k 8644, verapamil, tetrodotoxin (TTX), dibucaine, procainamide などの薬物は KCl 添加の 5 秒前に添加した。また, 本研究で使用した ethanol の濃度では, trypan blue 色素排泄試験に影響が認められないことを予備実験で確認した。

なお, 本研究で使用したラット膀胱平滑筋細胞は, 主として膀胱頂部より調製した細胞を用いた。

4) 蛋白質定量

膀胱平滑筋に含まれる蛋白質の定量は, 0.5 M NaOH により溶解した膀胱平滑筋細胞の一部を用い, ウシ血清アルブミンを標準物質として, Lowry らの方法⁹⁾に準じて行った。

5) 試薬

実験に用いた, $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ CaCl_2 (0.3511 GBq/mg) は, New England Nuclear (Boston, USA) より入手した。TTX は和光純薬 (大阪) より購入した。Verapamil, dibucaine, procainamide は Sigma Chemicals (St. Louis, USA) より, Bay k 8644 は Research Biochemicals Inc. (Natick, USA) よりそれぞれ入手した。抗ラットミオシン抗体は Dako Corp. (Glostrup, Denmark) より購入したものを使用した。その他の試薬は, 市販の特級試薬を用いた。

6) 統計的有意差の検定

得られた実験成績はすべて mean \pm SEM で表示した。統計的有意差の検定は, 分散分析による解析を行った後, 各図中の説明に記載した統計処理法により検定を行った。

なお, 本実験は, 川崎医科大学動物実験委員会の承認を受け, 同大学の動物実験指針に基づき施行された。

結 果

1) KCl (126 mM) 誘発性ラット膀胱平滑筋条の収縮に及ぼす ethanol および verapamil の影響

Ethanol は 126 mM KCl 誘発性膀胱平滑筋収

縮を濃度依存性に抑制した。この抑制作用は 50 mM でほぼ最大に達し, この場合の収縮は対照群の約 52% であった (Fig. 2)。また, 100 mM の濃度における収縮は, 50 mM と同様の抑制作用を示した (Fig. 2)。

Verapamil も ethanol の場合と同様に KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮を濃度依存性に抑制し, その最大抑制作用は 100 mM で観察され, しかもこの最大抑制作用の程度は 50 mM ethanol 単独存在下でみられた抑制の程度とほぼ同一であった (Fig. 3)。さらに, 50 mM ethanol と 100 mM verapamil の同時存在下では, それぞれの薬物の単独存在下で観察された最大抑制と同様の抑制作用のみが観察され (Fig. 3), 平滑筋収縮の抑制を相加的あるいは相乗的に抑制する現象は認められなかった。

2) 初代培養ラット膀胱平滑筋細胞への $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす ethanol の影響

Ethanol の初代培養ラット膀胱平滑筋細胞への Ca^{2+} 流入に対する影響は, 平滑筋細胞への $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を測定することにより検討した。KCl により膀胱平滑筋が収縮することなどの前項で明らかになったことから, まず KCl による $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入について予備検討を行った。

50 mM KCl 存在下における $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の経時的变化を検討したところ, 添加後 3 分まで

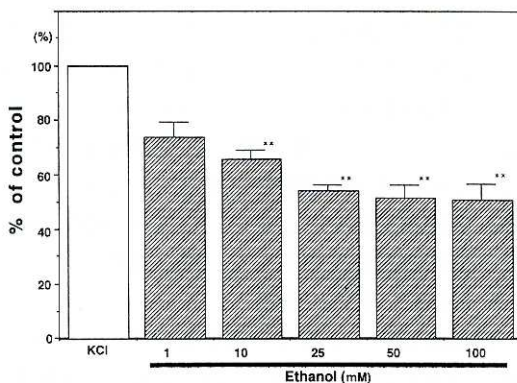


Fig. 2. Effect of ethanol on KCl (126 mM) -induced contraction of bladder smooth muscle strips. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the value in the presence of 126 mM KCl alone (Dunnett's test).

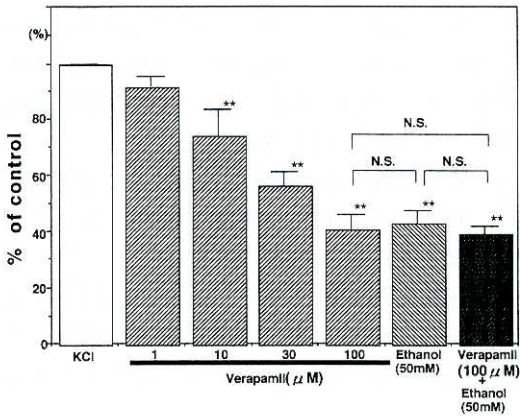


Fig. 3. Effect of verapamil on KCl (126 mM) -induced contraction of bladder smooth muscle strips. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the value in the presence of 126 mM KCl alone (Dunnett's test).

ほぼ直線的に $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入量の増加を認めたが、3分以降は経過とともに漸次流入量が減少するのが観察された (Fig. 4A)。

KCl はその添加後 3 分間では $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を濃度依存性に増加させ、50 mM の濃度では有意な $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の増加がみられた。また、100 mM では最大の $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入増加を誘発した (Fig. 4B)。

これらの実験成績、および膀胱平滑筋条において得られた実験成績から、以後の KCl 刺激による $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入の検討には、50 mM KCl を用い、反応時間は 3 分とした。

50 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は細胞膜脱分極阻害薬である TTX により濃度依存性抑制されるのが観察された (Fig. 5)。同様に細胞膜安定化作用を有する dibucaine および procaineamide によっても KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入が有意に抑制された (Fig. 5)。これらの実験成績から、KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は膀胱平滑筋細胞膜の脱分極を介して行われることが明らかとなった。

電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの選択的阻害薬である verapamil の KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす影響を検討したところ、verapamil は KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を濃度依存性に抑

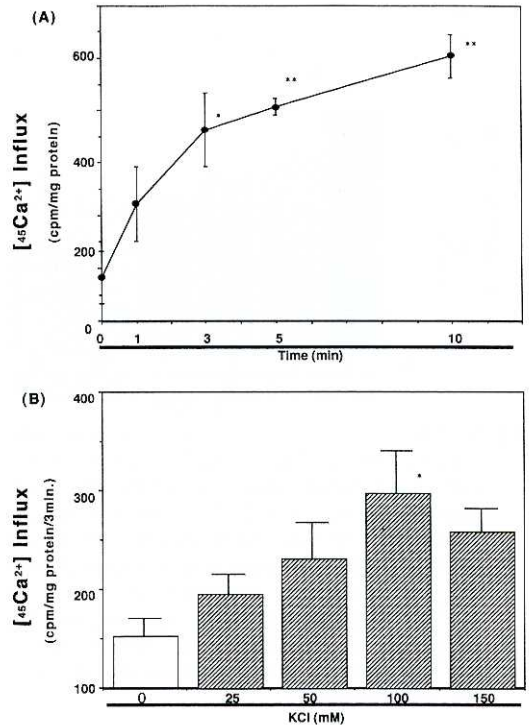


Fig. 4. Effect of KCl on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into rat bladder smooth muscle cells in primary culture. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. (A) Time course of 50 mM KCl -induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into bladder smooth muscle cells. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, compared with the value determined immediately after the addition of $1.26 \text{ mM } [^{45}\text{Ca}^{2+}]$ into the incubation buffer (Dunnett's test). (B) Effect of various concentrations of KCl on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx. * $p < 0.05$ compared with the value in the absence of KCl (Dunnett's test).

制し、 $1 \mu\text{M}$ 以上の濃度では、その阻害作用は最大に達しているのが認められ、しかもこの場合の $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は基礎流入量と同一であった (Fig. 6)。

一方、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化薬である Bay k 8644 による電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルを介した $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を検討したところ、本研究で使用した膀胱平滑筋細胞では、Bay k 8644 は濃度依存性に $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入を増加させるのが観察された (Fig. 7)。また、 $1 \mu\text{M}$ の Bay k 8644 により誘発された $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入量は 50 mM KCl による $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入量とほぼ同一であった (Fig. 7)。

3) 初代培養ラット膀胱平滑筋細胞における

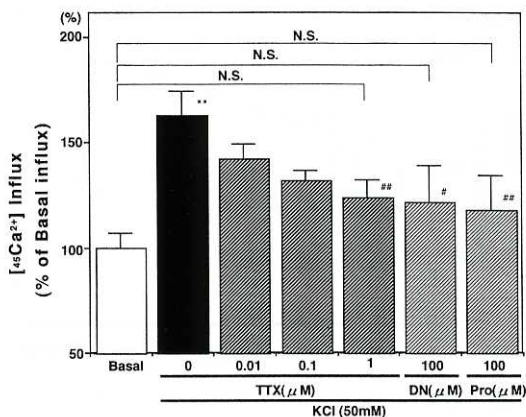


Fig. 5. Effect of various inhibitors for membrane depolarization on KCl (50 mM) -induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into rat bladder smooth muscle cells. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$, compared with the basal value of $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx determined in the absence of 50 mM KCl and other agents (Bonferroni's test). # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, compared with the value determined in the presence of 50 mM KCl alone (Dunnett's test). N.S.: not significant. TTX: tetrodotoxin, DN: dibucaine, Pro: procainamide.

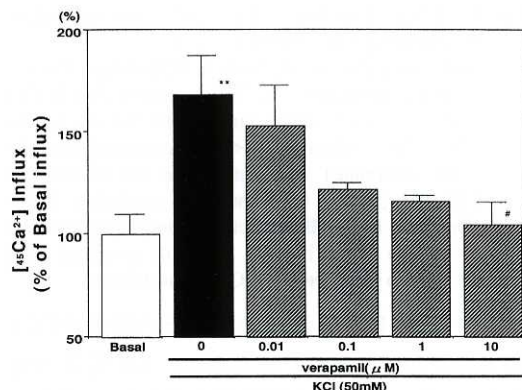


Fig. 6. Effect of verapamil on KCl (50 mM) -induced $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ influx into rat bladder smooth muscle cells. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$, compared with the basal influx (Bonferroni's test). # $p > 0.05$, compared with the value determined in the presence of 50 mM KCl alone (Dunnett's test).

KCl および Bay k 8644 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす ethanol の作用

Ethanol の膀胱平滑筋に KCl および Bay k 8644 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす影響を検討したところ、50 mM ethanol は、50 mM KCl および 1 μM Bay k 8644 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入をいずれ

も完全に抑制し、その場合の流入量は基礎流入量と同一であった (Fig. 8). なお, ethanol の単独存在下では、基礎 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入量に何ら影響を与えなかった (Fig. 8).

4) 膀胱頂部および底部より調製した平滑筋細胞における KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に及ぼす ethanol の作用の差違

膀胱平滑筋細胞への $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に対する ethanol の抑制作用が、平滑筋細胞を調製した膀胱部位により異なるか否かについても併せて

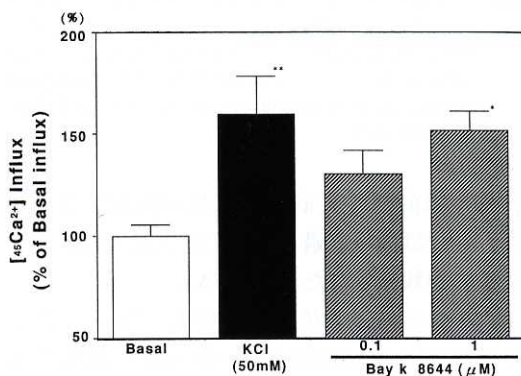


Fig. 7. Effect of Bay k 8644 on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ Influx into rat bladder smooth muscle cells. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$, compared with the basal influx (Bonferroni's test).

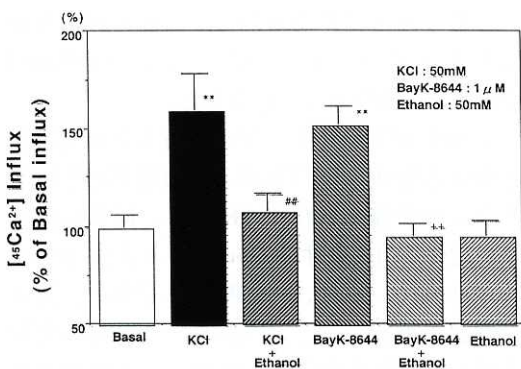


Fig. 8. Effects of ethanol on KCl and Bay k 8644 on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ Influx into rat bladder smooth muscle cells. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$, compared with the basal influx (Bonferroni's test). ## $p < 0.01$, compared with the value determined in the presence of KCl alone (Bonferroni's test). ** $p < 0.01$, compared with the value determined in the presence of Bay k 8644 alone (Bonferroni's test).

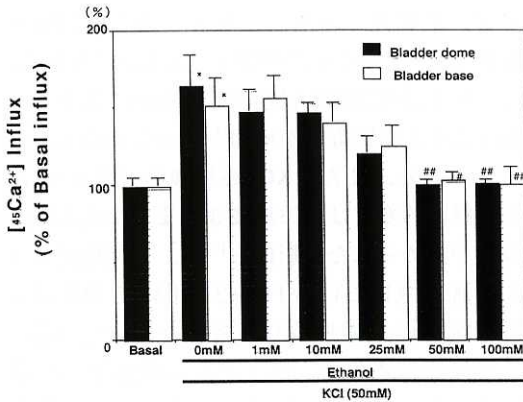


Fig. 9. Effects of ethanol on $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ Influx into rat bladder smooth muscle cells prepared from dome and base of bladder. Each value represents the mean \pm SEM obtained from 4 separate experiments. The basal influx of $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ into smooth muscle cells prepared from the dome and base of the bladder were 203.8 ± 9.9 and 203.4 ± 9.6 cpm/mg protein/3 min, respectively. ** $p < 0.01$, compared with the basal influx (Bonferroni's test). # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$, compared with the value determined in the presence of 50 mM KCl alone (Dunnett's test).

検討を加えた。すなわち、膀胱内尿道口を指標として、これより上部の膀胱頂部およびその下部の膀胱底部よりそれぞれ調製した平滑筋細胞における KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入に対する ethanol の作用を検討したところ、Figure 9 に示すように、膀胱頂部および底部より調製した平滑筋細胞における 50 mM KCl 誘発性 $[^{45}\text{Ca}^{2+}]$ 流入は、いずれも ethanol により濃度依存性に抑制され、その最大抑制作用はいずれの細胞においても 50 mM の ethanol 濃度で認められた。

考 察

従来飲酒により排尿障害を来すことはよく知られており、その原因として前立腺の浮腫・血流増加、ethanol による利尿作用が考えられている^{1), 2)}。一方、最近の研究において、ethanol が血管、胆嚢などの平滑筋に対して弛緩作用を示すこと^{3)~5)}が報告されており、さらに Yokoi らはラット膀胱平滑筋を用いた研究により、ethanol が膀胱平滑筋を弛緩させる作用があることを報告している⁶⁾。しかしながら、これら

の ethanol の平滑筋弛緩作用については十分解明がなされていない。膀胱平滑筋を含む平滑筋の収縮および弛緩には、 Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることはよく知られた事実である^{10), 11)}。すなわち、平滑筋の収縮は細胞外からの Ca^{2+} 流入、あるいは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの細胞質内への Ca^{2+} 遊離により誘発される細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に起因しており、一方、細胞外への Ca^{2+} の放出、あるいは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位への Ca^{2+} の再取り込みにより細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下することにより平滑筋は弛緩する¹¹⁾。上述の観点から、本研究では主としてラット膀胱平滑筋条およびラット膀胱より調製した初代培養平滑筋細胞をもちい、ethanol の膀胱平滑筋弛緩作用の発現機序について、細胞膜を介する Ca^{2+} 動態を中心として検討を行った。

本研究ではまず ethanol が膀胱平滑筋収縮を抑制するか否かを検討した。その結果、50 mM ethanol は KCl 誘発性膀胱平滑筋条を有意に抑制することが確認された。Yokoi ら⁶⁾は膀胱内圧を指標とした膀胱平滑筋収縮を検討しており、濃度依存性に ethanol は膀胱平滑筋の収縮を抑制することを観察しており、今回の本研究で得られた実験成績はこれらの実験成績とよく一致するものと考えられる。

電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である verapamil も ethanol と同様に KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮を有意に抑制すること、およびその抑制の程度は ethanol のそれとほぼ同様のものであることが本研究で明らかとなった。しかも、ethanol と verapamil の同時存在下においても、KCl 誘発性収縮の抑制の程度は、それぞれ ethanol あるいは verapamil の単独存在下で認められた抑制の程度と差はないのが観察された。このことは、これらの両薬物は相加的および相乗的の抑制作用を示していないことを意味すると考えられる。これらの実験成績から、ethanol と verapamil の KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮抑制機序は同一である可能性、すなわち ethanol の電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル阻害が

原因となつて、細胞外からの Ca^{2+} 流入が阻害されることにより ethanol の KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮の抑制作用が発現される可能性が示唆される。また、これらの薬物はいずれも KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮を完全に抑制し得ないことが認められ、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの膀胱平滑筋収縮への関与は部分的なものであることが明らかとなった。事実、平滑筋収縮機序にはムスカリン性アセチルコリン受容体および P_2 受容体^{11), 12)}、あるいは細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの遊離機構¹³⁾ などが関与することが報告されているが、本研究で認められた電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化に非依存性の KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮機構がいかなる機序を介しているかについては今後の検討課題と考えられる。

最近細胞内 Ca^{2+} 動態の検討には、 Ca^{2+} 蛍光指示薬である Fura-2 や Indo-1 を用いた検討が中心となっている^{14), 15)} が、この方法では、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には適しているものの、細胞外からの Ca^{2+} 流入もしくは、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を個別に検討するために細胞の前処置などを行う必要がある。本研究ではすでに ethanol が神経細胞などにおいて細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入に影響を与えることが明らかとなっていること⁹⁾、および上述のように ethanol が電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化を阻害し細胞外からの Ca^{2+} 流入を阻害することにより KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮を抑制する可能性が示唆されたことから、初代培養平滑筋細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を測定することにより、膀胱平滑筋細胞への細胞外からの Ca^{2+} 流入に及ぼす ethanol の影響を中心に検討を行った。

初代培養ラット膀胱平滑筋細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に対する KCl の濃度依存性を検討した。本研究では、KCl は 100 mM まで濃度依存性に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の増加をもたらしたが、150 mM では逆に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の低下を誘発するという bell 型の濃度依存曲線が得られた。予備実験として行った trypan blue を用いた色素排泄試験

では、本研究で使用した KCl の濃度は膀胱平滑筋細胞の viability に影響を与えないことから、この低下は細胞傷害に起因したものではなく、KCl による細胞毒性が原因となっているものと考えられる。また、KCl 添加後の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の経時変化は、添加後 3 分までは流入に直線性が認められた。影山ら¹⁵⁾ は、初代培養ラット膀胱細胞における Fura-2 を用いて KCl による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の検討を行っている。この研究によると、KCl による細胞内 Ca^{2+} 濃度は、60 秒から 120 秒にピークがあったと報告している。しかし、我々の検討では、3 分までは時間依存性に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入が増加し、それ以後では $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入が増加は認められず、影山らの報告に比べピークが遅く認められた。この違いは、実験に用いた膀胱平滑筋細胞の調製法の差違などが原因となっている可能性が考えられるが、詳細な理由は現在明らかではない。

KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の機序について細胞膜脱分極との関連性について検討したところ、TTX は濃度依存的に KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を抑制した。また、局所麻酔薬であり、細胞膜安定化作用を有する dibucaine および procainamide も TTX と同様に KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を濃度依存性に抑制した。これらの実験成績から、KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は膀胱平滑筋細胞膜の脱分極を介した機序であることは明らかと考えられる。

細胞膜脱分極を介して KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入が生じることから、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化がこの変化に関与していると考えられる。また末梢平滑筋組織では電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルが最も重要な役割を果たしていることは周知の事実である。従って、本研究では電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの選択的な阻害薬である verapamil が KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入にいかなる影響を与えるかについて検討した。その結果、verapamil は濃度依存性に KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を抑制し、 $1\mu\text{M}$ 以上の濃度で KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は基礎流入量と同一のレベルまで減少した。また、選

拮抗的な電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化薬である Bay k 8644 は濃度依存性に $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を増加させ、1 μM において認められた $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入量は、50 mM KCl により誘発された $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入量と同様であったが、基礎流入量に対しては Bay k 8644 は何らの影響も与えなかった。これらの実験成績から、KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は、細胞膜の脱分極により生じる電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの活性化を介した現象であることは確実と考えられる。

上述したように、ethanol は電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルの機能障害を介して膀胱 KCl 誘発性平滑筋収縮を抑制する可能性が示唆されていることから、Bay k 8644 により直接活性化された電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルを介する $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に対する ethanol の作用を検討した。その結果、50 mM ethanol は KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入のみならず、Bay k 8644 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入をも完全に阻害させることが明らかとなった。このデータは、ethanol が電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネルを直接抑制する作用を有していることを意味すると考えられる。これらの実験成績を勘案すると、本研究で示した ethanol の KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮抑制作用は、ethanol による電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化障害を介した平滑筋細胞への Ca^{2+} 流入阻害に起因していると考えられる。膀胱頂部および底部よりそれぞれ調製した平滑筋細胞における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に対し、ethanol は両部位より調製した平滑筋細胞における 50 mM KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を濃度依存性に抑制し、その最大抑制作用はいずれの細胞においても 50 mM の濃度で認められた。従って、ethanol の膀胱平滑筋における $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入の抑制作用は、膀胱部位の差違に関係なく生じるものと考えられる。

結 語

Ethanol が膀胱平滑筋を弛緩させる可能性が示唆されていることから、本研究ではラット膀胱平滑筋条および初代培養ラット膀胱平滑筋細

胞を用い、ethanol の KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入に及ぼす影響を測定することにより、ethanol の膀胱平滑筋収縮抑制作用機序について検討を行い、以下の結果を得た。

1) KCl は濃度依存性に膀胱平滑筋条を収縮させた。この収縮は ethanol および verapamil により有意に阻害され、しかもこれらの両薬物の同時存在下における膀胱平滑筋収縮の阻害の程度は、これらの薬物の単独存在下でみられた収縮阻害の程度と同一であった。

2) KCl は膀胱底部より調製した平滑筋細胞への $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を濃度依存性および incubation 時間依存性に増加させた。

3) KCl (50 mM) 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は細胞膜脱分極阻害薬である TTX、および細胞膜安定化薬である dibucaine および procainamide により濃度依存性に抑制された。また、KCl (50 mM) 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル阻害薬である verapamil により濃度依存性に抑制され、10 mM verapamil はこの $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を完全に消失させた。これらの成績から、KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入は平滑筋細胞膜脱分極により誘発された電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化を介して生じることが判明した。

4) Ethanol は KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入を濃度依存性に抑制し、50 mM で完全に流入を抑制した。また、電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化薬である Bay k 8644 により誘発される $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入も 50 mM ethanol により完全に抑制された。

5) Ethanol による KCl 誘発性 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 流入抑制は、膀胱頂部および底部より調製した平滑筋細胞のいずれにおいても認められ、流入抑制作用の程度に差違は認められなかった。

6) 以上の実験成績から、ethanol による KCl 誘発性膀胱平滑筋収縮の抑制は、ethanol が平滑筋細胞膜の脱分極により誘発される電位依存性 L 型 Ca^{2+} チャネル活性化を介した細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制することにより発現されることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜わりました川崎医科大学泌尿器科学教室 田中啓幹教授ならびに森岡政明助教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり御指導、御鞭撻を頂きました川崎医科大学薬理学教室 大熊誠太郎教授に深謝いたし

ますとともに、直接御指導いただいた川崎医科大学薬理学教室 桂昌司助手をはじめ大学院生、研究補助員の方々に心より謝意を表します。

本論文の要旨は、第5回日本神経因性膀胱学会において発表した。なお、本研究の一部は日本私学振興財団私立大学等経常費補助金特別補助(大学院重点特別経費・学生分、1997年度)の助成により行われたことを付記し、謝意を表します。

文 献

- 1) Reihamann M, Bruskewitz RC : Benign prostatic hyperplasia : Clinical manifestations and indications for intervention. *In* Prostate disease. eds by Lepor H, Lawson RK. Tokyo, WB Saunders Co. 1993, pp 108-118
- 2) Grayhack JT, Kozlowski JM : Benign prostatic hyperplasia. *In* Adult and Pediatric Urology 2nd ed. eds by Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW, Baltimore, Mosby Year Book. 1991, pp 1211-1276
- 3) Masui H, Wakabayashi I, Hatake K, Yoshimoto S, Sakamoto K : Effects of ethanol on contractile response on gall bladder isolated from guinea pig. *Eur J Pharmacol* 248 : 103-110, 1993
- 4) Strickland JA, Wooles WR : Effect of acute and chronic ethanol on the agonist responses of vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 152 : 83-91, 1988
- 5) Briner VA, Tasai P, Wang X, Schrier RW : Divergent effects of acute and chronic ethanol exposure on contraction and Ca^{2+} mobilization in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 6 : 268, 1993
- 6) Yokoi K, Ohmura M, Kondo A, Miyake K, Saito M : Effects of ethanol on in vivo cystometry and in vitro whole bladder contractility in the rat. *J Urol* 156 : 1489-1491, 1996
- 7) 馬 福海, 東頭華衣, 木村喜代志, 花井 禎, 際本 宏, 朴 英哲, 栗田 孝 : 酵素処理法によるヒト膀胱体部平滑筋細胞の培養. *日泌会誌* 88 : 299, 1997
- 8) Ohkuma S, Katsura M, Hibino Y, Xu J, Shirogami K, Kuriyama K : Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca^{2+} channels in mouse cerebral cortical neurons. *Mol Brain Res* 54 : 133-140, 1998
- 9) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 266-275, 1951
- 10) 大熊誠太郎, 栗山欣弥 : ethanol の神経系に及ぼす影響 - 生化学・薬理学的観点 -. *神経精神薬理* 6 : 587-628, 1984
- 11) Suzuki S, Kokubunn S : Subtype of purinoceptors in rat and dog urinary bladder smooth muscles. *Br J Pharmacol* 112 : 117-122, 1994
- 12) Imaizumi Y, Henmi S, Uyama Y, Watanabe M, Ohizumi Y : Effects of 9-methyl-7-bromoeudistomin D (MBED), a powerful Ca^{++} releaser, on smooth muscles of the guinea-pig. *Ann NY Acad Sci* 707 : 546-549, 1993
- 13) Damaser MS, Kim KB, Levin RM : Calcium regulation of urinary bladder function. *J Urol* 157 : 723-738, 1997
- 14) 林 秀晴, 幸田 肇, 佐藤 洋 : 蛍光色素法による複数の単離心筋細胞内イオン濃度の同時測定・呼吸と循環 43 : 159-164, 1995
- 15) 影山慎二, 大田原佳久, 宮川厚夫, 新保 齊, 栗田 豊, 牛山知己, 鈴木和雄, 藤田公生 : ラット初代培養細胞における細胞内カルシウム濃度変動の検討. *日本神経因性膀胱学会誌* 7 : 3-8, 1997