

# 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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-















拮抗的な電位依存性 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化障害を介した平滑筋細胞への  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル活性化を介した細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  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, Bruskevitz 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<sup>2+</sup> 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, Shirota K, Kuriyama K : Multiple actions of nitric oxide on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> 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-bromo-eudistomin D (MBED), a powerful Ca<sup>2+</sup> 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