モルモット摘出腸管の運動に及ぼす麻ひ性貝毒の影響

(昭和 60 年 4 月 19 日受理)

知見 憲次^{*1} 田場 典治^{*2}
勝田 新一郎^{*3} 新谷 勲^{*1}Effects of Paralytic Shellfish Poison on the Movements of
Excised Small Intestine of a Guinea PigKenji CHIMI^{*1}, Noriji TABA^{*2}, Shin-ichiro KATSUDA^{*3} and Isao NIIYA^{*1}

(^{*1}Japan Institute of Oils, Fats & Other Foods Inspection, Foundation, Osaka
Laboratory: 3-8-9, Tenjinbashi, Kita-ku, Osaka, Japan; ^{*2}Department of
Animal Management, Kobe University, School of Agriculture: 1-1,
Rokkodai-cho, Nada-ku, Kobe, Japan; ^{*3}Department of Physiology,
Division II, Kobe University, School of Medicine: 7-5-1,
Kusunoki-cho, Chuo-ku, Kobe, Japan)

This study was performed in order to investigate the effects of gonyautoxins (GTXs) and tetrodotoxin (TTX) on the movement of the excised small intestine of a guinea pig.

The results may be summarized as follows:

1) The peristaltic movement appeared when pressure was applied to the internal wall of the excised intestinal canal by the method of Trendelenburg. However, after pretreatment of the intestine with GTXs (1.0 MU/ml) for 2 min, this movement was not observed.

2) The tonic contractions of the intestinal preparation induced by adding acetylcholine (ACh, 1×10^{-7} g/ml) to the organ bath were not suppressed by pretreatment with GTXs (1.0 MU/ml) or TTX (1.0 MU/ml) for 3 min.

3) The contractions induced by nicotine (1×10^{-5} g/ml) were markedly suppressed by pretreatment with GTXs (1.0 MU/ml) or TTX (1.0 MU/ml) for 3 min.

4) The contractions of the intestinal preparation elicited by transmural electrical stimulation (0.5 msec duration, 40 Hz supramaximal voltage) were completely suppressed by pretreatment with GTXs (1.0 MU/ml) or TTX (1.0 MU/ml) for 3 min.

From these results, it may be concluded that GTXs have inhibitory effects on the liberation of ACh from the nerve endings, but not on the ACh receptor of the smooth muscle.

(Received April 19, 1985)

Key words: ゴニオトキシン群 gonyautoxins; 小腸 small intestine; 蠕動運動 peristaltic movement; 収縮 contraction; アセチルコリン acetylcholine; ニコチン nicotine; 経壁電気刺激 transmural electrical stimulation; 麻ひ性貝毒 paralytic shellfish poison

^{*1} 財団法人日本食品油脂検査協会大阪検査所: 大阪市北区天神橋 3-8-9

^{*2} 神戸大学農学部家畜管理学教室: 神戸市灘区六甲台町 1-1

^{*3} 神戸大学医学部第二生理学教室: 神戸市中央区楠町 7-5-1

麻性貝毒 paralytic shellfish poison (PSP) は gonyautoxins (GTX 群), saxitoxin (STX) 及び neo-saxitoxin (neoSTX) の総称であり, フグ毒 tetrodotoxin (TTX) に匹敵する毒力を有する自然毒¹⁾である。我が国で発現する PSP は主として GTX 群であり, STX 及び neoSTX は微量であるとされている²⁾。

TTX のモルモット腸管運動に及ぼす作用については多くの報告^{3)~5)}がある。それらによると, TTX は腸平滑筋支配神経末端からの acetylcholine (ACh) の遊離を抑制して神経興奮伝達を阻害し, 腸管運動を抑制するという。一方, 守時⁶⁾は PSP 原因プランクトンの一種 *P. Catenella* について, モルモット腸管運動に及ぼす作用を検討し, このものが電気刺激に対する腸管の収縮反応を抑制する可能性を推論した。

PSP の薬理作用については, まだ十分に明らかにされていないが, TTX のそれに極めて類似するといわれている⁷⁾。そこで著者らは, GTX 群も TTX 同様に何らかの形で腸管運動に関与するのではないかと推測し, 本実験を試みた。モルモットから常法に従って腸管を摘出し, それについて, 蠕動運動, ACh 及び nicotine の腸管収縮作用, 腸管電気刺激効果などに対する GTX 群の影響を検討し, 併せて TTX の影響と比較した。

実験方法

1. 実験材料

体重 250~450 g の雄性 Hartley モルモット (静動協より購入) の腸管を実験材料として用いた。常法に従いモルモットを撲殺, 頸部より十分に放血後開腹して, 回盲腸接合部から 15 cm を除いた回腸部位を摘出した。これを栄養液中に浸し, 付着している腸間膜を切除し, 内容物を栄養液で洗い出した後に実験に供した。

2. 栄養液

栄養液としてはタイロード液を用いた。その組成は, 塩化ナトリウム 137 mM, 塩化カリウム 2.7 mM, 塩化カルシウム 1.8 mM, 炭酸水素ナトリウム 12.0 mM, リン酸一ナトリウム 0.4 mM, 塩化マグネシウム 1.0 mM, glucose 5.5 mM とした。

3. 使用薬物及び試薬

GTX 群は1979年岩手県大船渡湾で採取したホタテガイの中腸腺から抽出・精製⁸⁾したもので, GTX₁, GTX₂ 及び GTX₃ をともに含んでいるものである。使用に際して, 毒力の検定⁹⁾をした後, 栄養液で希釈して 1.0 マウス単位 (MU)/ml の濃度に調製した。

TTX は Tetrodotoxin, Crystalline 3X (三共) を蒸留水に希釈, 10 µg/ml 濃度の TTX 液を作製し, これを保存液とした。用時, 毒力検定⁹⁾の後, 栄養液で希釈し, 1.0 MU/ml の濃度に調製した。

なお, 1 MU は, GTX 群では体重 20 g のマウスを15分間で殺す毒量であるが, TTX では同体重のマウスを30分間で殺す毒量である。

その他の薬物としては acetylcholine chloride (和光純薬(株)), nicotine (和光純薬(株))を用いた。

4. 腸管の蠕動運動記録法

腸管蠕動運動に対する被検薬物の効果を検討するために, トレンデレンブルグ法¹⁰⁾に従って標本に蠕動運動を誘発し, これを記録した。36~37° の栄養液を満した 30 ml 容の二重円筒形ガラス製恒温槽 (以下浴槽とする) の中に腸管片を置き, その口側端を糸で閉鎖した。その糸をトランスデューサーに連結, 標本の長さの変化を, 増幅器を介してペン書きオシログラフ上に記録できるようにした。

標本の尾側端は浴槽内のU字管に連結した。これをキャニュレを介して栄養液を入れたマリOTT瓶に接続し, 液が腸内腔に通ずるようにした。瓶の上端口はタンブールを介してトランスデューサーに連結, 腸内腔の容積変化を, 同じく増幅器を介し, ペン書きオシログラフ上に記録できるようにした。

次に, マリOTT瓶を一定の高さに上昇させて腸内腔を栄養液で加圧, 蠕動運動を誘発し, 標本の正常な縦径・容積変化を1分間記録した。ついで, 浴液を GTX 群含有浴液と交換, 2分後に, 再び, 縦径・容積変化を記録した。浴液には下部より混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) を常時供給した。

5. 摘出腸管の縦径運動記録法

ACh, nicotine の腸管収縮作用に対する GTX 群, TTX の影響を検討するために, マグヌス法¹¹⁾に従って標本の縦径運動を記録した。

マグヌス装置内の浴槽 (容量 10 ml) の温度を 37° に保持, 槽内の栄養液には混合ガス (95% O₂, 5% CO₂) を常に一定量供給した。

摘出した腸管は長さ約 3cm の切片とし, その一端をミシン糸で浴槽底部に固定, 他端を郷原式ヘーベルに連結し, 約60分間放置し, 標本を環境に順応させた。その間, 15分毎に浴液を交換した。

浴液に ACh または nicotine を加え, 発生する等張性収縮をヘーベルを介して煤煙紙上に記録した。ついで, 液を交換し, GTX 群または TTX を投与して標本を処理, これについて, 再び ACh または nicotine を作用させ, 各薬物に対する標本の反応を観測した。この際, ヘーベルによる拡大率は約6倍とした。

6. 腸管経壁電気刺激法

摘出腸管電気刺激に対する GTX 群, TTX の影響を検討した。前記マグヌス装置の浴槽内に栄養液を満したし, 標本の下端を固定, 上端はミシン糸でヘーベルに連結した。刺激は腸管内腔に挿入した白金線電極 (直径 2 mm) によって行い, リング状白金板製不関電極 (幅 1 cm) は腸管周囲に位置させた。

浴槽内に GTX 群または TTX を投与し, 電気刺激装置を用い, 幅 0.5 msec, 強度 90 V, 頻度 40 Hz の矩形

Fig. 1. Effects of gonyautoxins (GTXs) on peristalsis of excised guinea pig small intestine

The excised small intestine preparation was suspended in an organ-bath filled with warm, oxygenated Tyrode's solution. Peristalsis was induced by an increase in the inner pressure due to the infusion of Tyrode's solution into the preparation. GTXs (1.0 MU/ml) were added to the Tyrode's solution in the organ-bath. A: nontreatment (Control); B: GTXs treatment; Volume: Changes in the volume of the preparation; Length: Changes in the length of the preparation.

波刺激を5秒間反復して標本に加えた。それによる等張性収縮の経過をヘーベルを介して煤煙紙上に記録した。

実験結果

1. 腸管蠕動運動に対する GTX 群の影響

摘出腸管について、トレンデレンブルグ法により腸内腔を加圧して蠕動運動を誘発し、GTX 群に対する腸管の反応を観察・記録した。

Fig. 1 A は、正常の蠕動運動を、容積変動と縦径変動の二要素に分けて描記したものである。この場合曲線に明らかなように、容積変動、縦径変動とも極めて律動的な動揺を示しており、変動の振幅もかなり大きい。これより標本の蠕動運動が極めて活発で、しかも安定していることがわかる。

Fig. 1 B は、前記腸管の溶液を GTX 群 (1.0 MU/ml) 含有溶液に交換、2 分後マリOTT 瓶を上昇、腸内腔を加圧したときの記録である。これより、容積変動のみならず縦径変動も現れず、腸管の蠕動運動が GTX 群により完全に抑制されていることが観察される。

2. ACh の腸管収縮作用に対する GTX 群、及び TTX の影響

摘出腸管を浴槽内に懸垂し、その溶液 9.0 ml 中に 1×10^{-6} g/ml ACh 1.0 ml を投与、30秒間腸管に ACh を作用させ、発生する収縮反応を記録した。ついで、溶液を3回交換して ACh を浴槽から洗い出し、3分後、再び ACh を投与、それによる腸管反応を記録した。このような操作を数回繰返し、その都度、収縮反応を記録して、これを control とした。

次に溶液を GTX 群 (1.0 MU/ml) 含有溶液と交換、腸管を GTX 群で処理し、これについて、3分後に前記同様、ACh を作用させたところ、標本は GTX 群処理前と同等な収縮反応を示した (Fig. 2 A)。

Fig. 2. Effects of GTXs, or tetrodotoxin (TTX) on excised guinea pig small intestine contraction induced by acetylcholine (ACh)

ACh (1×10^{-7} g/ml) was added to the organ-bath, and later washed out of the bath. Isotonic contractions of the preparation induced by ACh were recorded as control prior to GTXs, or TTX treatment. The preparation was then treated with GTXs (1.0 MU/ml), or TTX (1.0 MU/ml) for three min. A: GTXs treatment; B: TTX treatment. The dots show the addition of ACh to the organ-bath. The bar mark indicates the addition of GTXs, or TTX to the organ-bath.

Fig. 3. Effects of GTXs, or TTX on excised guinea pig small intestine contractions induced by nicotine

Nicotine (1×10^{-5} g/ml) was added to the organ-bath, and later washed out of the bath. Isotonic contractions of a nontreated preparation elicited by nicotine were recorded. The preparation was then treated with GTXs (1.0 MU/ml), or TTX (1.0 MU/ml) for three min. A: GTXs treatment; B: TTX treatment. The dots indicate the addition of nicotine to the organ-bath. The bar marks indicate the addition of GTXs, or TTX to the organ-bath.

Fig. 2 B は TTX (1.0 MU/ml) 処理標本について、同様な実験を行ったときの記録である。これより、TTX 処理においても、GTX 群処理におけると同様に、処理前後で、同等の収縮応が起っているのが観察される。

3. Nicotine の腸管収縮作用に対する GTX 群、及び TTX の影響

浴槽内に懸垂した腸管について、その浴液 9 ml に 1×10^{-4} g/ml nicotine 1.0 ml を添加し、30秒間 nicotine を作用させた。それによる腸管収縮反応を記録した後、ただちに浴液を 3 回交換し、浴槽を洗浄した。3 分後、再度、浴液に nicotine を投与、発生する腸管反応を記録した。この操作を数回反復し、正常の腸管反応を観察・記録した。

ついで、浴液を GTX 群 (1.0 MU/ml) 含有浴液と交換し、腸管を GTX 群で処理した。この腸管について、3 分後、前記同様、nicotine を作用させたが、収縮反応は全く観察されなかった (Fig. 3 A)。

同様の方法で、1.0 MU/ml TTX 処理標本について、nicotine に対する腸管反応を観察したが、GTX 群処理におけると同様、収縮反応は観察されなかった (Fig. 3 B)。

4. 腸管経壁電気刺激に対する GTX 群、及び TTX の影響

Fig. 4 は腸管経壁電気刺激を行い、発生する腸管の収縮反応を記録したものである。

図中の丸印の位置で、電気刺激 (幅 0.5 msec, 強度 90 V, 頻度 40 Hz) を 5 秒間連続的に加えた後、3 分間、腸管を休ませた。この操作を数回繰返し、腸管の電気刺激に対する正常の収縮反応を観察・記録した。ついで、腸管の浴液を 1.0 MU/ml GTX 群含有浴液と交換し、標本に GTX 群処理を施した。処理 3 分後に、再び電気刺激を加えたが、腸管の収縮は観察されなかった (Fig. 4 A)。

同様の方法で、TTX (1.0 MU/ml) 処理前後に電気刺激を行い、腸管の収縮反応を記録したが、TTX 処理後

Fig. 4. Effects of GTXs, or TTX on excised guinea pig small intestine contractions elicited by transmurally electrical stimulation

The excised small intestine was repeatedly stimulated by transmurally supramaximal stimulation (90 V, 0.5 msec duration) and its isotonic contractions were recorded. Thereafter the preparation was treated with GTXs (1.0 MU/ml), or TTX (1.0 MU/ml) and stimulated again. A: GTXs treatment; B: TTX treatment. The dots indicate when the preparation was stimulated. The bar marks indicate the addition of GTXs, or TTX to the organ-bath.

においても収縮反応は観察されなかった (Fig. 4 B).

考 察

腸管の筋組織は、外層の縦走筋、内層の輪状筋の2層で構成され、縦走筋と輪状筋とはさまれた部分に副交感神経性のアウエルバッハ神経叢がある。また、輪状筋の内側、粘膜下組織の外側に交感神経性といわれるマイスナー神経叢がある。両神経叢とも自律神経支配を受けているが、自律神経系を切断しても、神経叢自身に自動中枢の働きがあるので、蠕動、振子及び分節などの運動が行われる。

Trendelenburg¹⁰⁾ は、腸管内腔を栄養液で加圧して起こる蠕動運動で観察される容積変動は輪状筋と縦走筋の働きを表現し、懸垂腸管の上下動の縦径運動は縦走筋の活動を表すと考えている。本実験で、トレンデレンブルグ法により、GTX 群処理後に腸管内腔の加圧を行ったが、蠕動運動は発現せず、容積変動及び縦径運動は共に観察されなかった。すなわち、GTX 群は輪状筋と縦走筋の活動に対して抑制的に作用し、両筋を弛緩させる働きがあると推察される。

この筋弛緩の要因として、GTX 群が筋実質、あるいは筋の ACh 受容体に作用して筋弛緩を生じたのか、それとも筋支配神経に影響を及ぼした結果に起因するのかを ACh 添加実験を行って検討した。

腸管に ACh を作用させると、平滑筋の ACh 受容体が、ACh を受けとめて、筋線維膜が脱分極を起こし、平滑筋は、電気刺激に対する閾値を下げて興奮性を高め、自発性興奮を増強して収縮をもたらす。

1.0 MU/ml GTX 群で腸管を処理した後に、ACh を作用させても、処理前と同様の収縮を示しており、また、1.0 MU/ml TTX 処理の場合も結果は同じであった。

このことは、GTX 群及び TTX は筋実質及び筋側の ACh 受容体に対して、抑制的作用を有しないことを示唆している。

そこで、筋支配神経に対して GTX 群、及び TTX が抑制的に作用するのかを検討するために、nicotine 添加実験を行った。

nicotine は腸管に対して、大量では神経遮断薬としての効果を有するが、少量では神経節に刺激薬として作用する^{12), 13)}。nicotine の腸管収縮作用機序の1つに、神経節のニコチン性受容体を刺激、神経節細胞を興奮させ、神経終末部より ACh を放出させて、腸管を収縮させるという一連の過程が想定¹⁴⁾されている。そこで、少量の nicotine を腸管に作用させ、その反応を確認した後、GTX 群あるいは、TTX で処理後再び nicotine を作用させたが、腸管反応は観察されなかった。このことから GTX 群及び TTX は一連のニコチン腸管収縮作用機序のいずれかの過程において、ニコチン作用を阻害する働きがあると推察した。

ついで、GTX 群がニコチン性受容体に対してのみ抑

制的に働くのか、あるいは神経節を含めた神経性要素に対して作用するのかを明らかにするために電気刺激実験を行った。

Paton¹⁵⁾ は腸管に対して、経壁電気刺激を行うと、神経節後線維が脱分極、神経終末部より ACh が放出され、これが筋側の ACh 受容体と結合して収縮を起こすと報告している。しかし、腸管を GTX 群あるいは TTX 処理すると、電気刺激にもかかわらず、腸管は収縮しなかった。

本実験では、モルモット腸管平滑筋収縮反応に対する GTX 群の効果について、TTX を対照に検討を行った。その結果、GTX 群はトレンデレンブルグ法により腸管内圧の増加による蠕動運動の亢進を著明に抑制した。また、GTX 群と TTX は ACh の収縮に影響せず、nicotine による収縮、また経壁電気刺激による腸管収縮を著しく抑制した。

TTX の平滑筋に対する薬理作用^{3), 4)} は詳細に検討されており、平滑筋の神経要素に由来する反応のみを遮断、ACh の放出を抑制し、受容体を含む筋要素に関係する反応には影響を与えないことが明らかとなっている。

GTX 群と TTX が腸管平滑筋収縮反応に対して同じ結果を示したことから、ただちに、両者が全く同様の薬理作用を有すると判断することはできない。しかしながら、GTX 群の腸管に対する作用は、筋側の ACh 受容体に作用するのではなくて、神経節を含む神経要素に作用して、ACh の放出を阻害すると推察される。

要 約

1979年大船渡湾で採取したホタテガイの中腸腺より分離・精製した GTX 群について、モルモット摘出小腸管の運動に及ぼす効果を検討し、併せて TTX の効果と比較した。

1) 腸管を GTX 群 (1.0 MU/ml) で2分間処理すると、正常時に栄養液による腸管内腔加圧によって観察された蠕動運動は著明に抑制された。

2) ACh (1×10^{-6} g/ml) による腸管収縮反応は、標本を GTX 群 (1.0 MU/ml) で3分間処理しても、ほとんど抑制されることはなかった。なお、TTX (1.0 MU/ml) についても、同じ結果が得られた。

3) nicotine (1×10^{-4} g/ml) による腸管収縮反応は、GTX 群 (1.0 MU/ml) の3分間処理によって完全に抑制された。また、TTX (1.0 MU/ml) も同様な抑制効果を示した。

4) 経壁電気刺激による腸管の収縮反応は、GTX 群 (1.0 MU/ml) で3分間処理すると、強く抑制された。また、TTX (1.0 MU/ml) についても、同様の所見が得られた。

以上の結果から、GTX 群の腸管平滑筋に対する収縮抑制効果は、平滑筋及び ACh 受容体が抑制されること

によるのではなく、コリン作動性神経末端からの ACh の放出が阻害されることに起因すると推定した。

終りに、本研究を遂行するに当り、御指導、御協力頂いた大阪府立大学矢ヶ崎修教授、大阪市立環境科学研究所清水充氏に深甚な感謝の意を表する。

文 献

- 1) 清水 譲: 化学と生物 **18**, 792~799 (1980).
- 2) 野口玉雄, 橋本周久: 医学のあゆみ **112**, 861~870 (1980).
- 3) Ogura, Y., Mori, Y., Watanabe, Y.: J. Pharmac. exp. Ther. **154**, 456~462 (1966).
- 4) 浜田純一: 千葉医会誌. **36**, 1358~1368 (1960).
- 5) Paton, W. D. M., Vizi, E. S., Zar, M. A.: J. Physiol. **215**, 819~848 (1971).
- 6) 守時英喜: “有毒プランクトン” 岡市友利, 安元健, 橋本周久, 林孝市郎編 p. 35~40 (1982) 恒星社厚生閣.
- 7) Kao, C. Y.: Pharmac. Rev. **18**, 997~1049 (1966).
- 8) 知見憲次, 奥田輝雄, 丸山武紀: 食衛誌. **24**, 125~129 (1983).
- 9) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針” II p. 240~244, 231~240 (1978) (社)日本食品衛生協会.
- 10) Perry, W. L. M.: “Pharmacological Experiments on Isolated Preparation” p. 80~81 (1968). E & S Livingstone Ltd., Edinburgh and London.
- 11) 田村豊幸, 藤井 彰: “薬理学実験法” p. 215~219 (1981) 協同医書出版社.
- 12) 木村正康, 木村郁子: 薬局 **24**, 843~849 (1973).
- 13) 粕谷 豊, 渡辺稔訳: “薬理学教程” p. 1~45 (1980) 朝倉書店.
- 14) 小管卓夫, 林栄一: 医学のあゆみ **112**, 871~876 (1980).
- 24) Paton, W. D. M., Vizi, E. S., Aboozar, M.: J. Physiol. **215**, 819~849 (1971).