増感作用の薬理学的研究 (第 2 報¹⁾) シロネズミ摘出精管増感作用の特異性

五味保男, 保科憲二, 大橋富次

金沢大学薬学部²⁾

Pharmacological Studies on Supersensitization. II.¹⁾ Specificity of Drug-induced Supersensitivity of Isolated Vas Deferens of Rat

YASUO GOMI, KENJI HOSHINA and TOMIJI OHASHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University²⁾

(Received August 11, 1975)

Dose-response relationship of potentiation of contractile response of isolated vas deferens of a rat to norepinephrine (norepi) and acetylcholine (ACh) by seven potentiators, including cocaine, tripeleennamine, diphenhydramine, and phentolamine, were examined. The maximum response of epididymal portion of vas deferens to both agonists was greater than that of prostatic portion and the degree of increase in maximum response induced by the potentiators was in reverse relation to the degree of maximum response. Potentiators increased the maximum response of vas deferens to norepi and ACh up to the same level of maximum response induced by transmural electrical stimulation, which was estimated to be the mechanical limit of contracture. The mechanism of increase in sensitivity and that in maximum response to norepi seemed to be different, but linear relation between increase in sensitivity and that in maximum response to ACh was recognized. Linear relation was also recognized between increase in maximum response to norepi and ACh. Dibenamine inhibited the increase in sensitivity of vas deferens to ACh by cocaine selectively. From these results, the supersensitization of vas deferens of a rat was classified into four groups: (1) Presynaptic catecholamine potentiation, (2) Dibenaminesensitive cocaine-induced supersensitivity, to ACh, (3) Dibenamine-insensitive supersensitivity to ACh, and (4) The so-called nonspecific increase in maximum response to norepi and ACh.

前報¹⁾で著者らは、増感物質の作用を生体の反応性を増大させる効果 (ρ : 最大反応値の増大率) と薬物感受性を増大させる効果 (R : 増感物質適用前後における agonist の equipotent-dose ratio) とにわけて定量的に考察することを試みた。しかし前報で用いたモルモット摘出精管は cocaine などの増感物質によって反応性の増大を生じなかったため、本報では cocaine で反応性増大が生じることの知られている^{3,4)} シロネズミ摘出精管に上記の方法を適用し、まず種々の増感物質の反応性増大作用と感受性増大作用の用量反応相関を明らかにし、ついで両増大率の相関関係を解析することによって増感物質の反応性増大作用と感受性増大作用の機作の異同について考察し、あわせて増感物質の norepinephrine 増強作用と acetylcholine 増強作用の比較検討を行なった。

実 験 の 部

実験方法 Wistar 系シロネズミ (雄, 体重 200—300 g) の精管の stripped preparation を 32° の Tyrode 液中に懸垂し、その等張性収縮を張力 0.2 g, 拡大率 8 倍で煤煙紙上に記録した。シロネズミ精管は睪丸側部と精囊側部で薬物に対する反応性および感受性が異なるので、中央部で切断しそれぞれの条片について別に検討した。agonist は累積的に適用し、収縮反応が最大に達した時点で標本を洗浄してからつぎの適用までに 25 min (tyramine の場合は 30 min) の間隔をおいた。増感物質は agonist 適用の 10 min 前に適用した。精囊側部に norepinephrine を繰りかえし適用すると感受性がわずかに増大したので、増感係数 R の算定に際して補正した。

- 1) 第 47 回日本薬理学会総会 (東京, 1974 年 4 月) および第 51 回日本薬理学会関東部会 (東京, 1974 年 11 月) で発表, 第 1 報: 五味保男, 紺谷 仁, 薬誌, 95, 1043 (1975).
- 2) Location: Takaramachi, Kanazawa.
- 3) Y. Kasuya, K. Goto, *Europ. J. Pharmacol.*, 4, 355 (1968).
- 4) S. Greenberg, J.P. Long, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 177, 136 (1971).

その他の場合は標本の反応性および感受性の経時変化が有意でなかったので補正しなかった。経壁電気刺激は白金線電極を用い、電極間隔 1 cm, 50 msec, 70 V, 40 cps (日本光電 MSE-3 R) で tonic contraction がえられるまで 10—15 sec 刺激した。

増感効果の表記は前報¹⁾に準じ、増感物質によって生じた agonist の最大反応値の増大率 (ρ) と増感物質適用前後の agonist の log dose-percent response curve (log DRC) に平行線試験法を適用し求めた agonist の equipotent-dose ratio (R) によって行ない、それぞれの平均値および 95% 信頼限界であらわした。増感物質は同一標本に 3—4 用量を順次濃度を高めながら適用し、cocaine および tripeleennamine は律動性収縮が生じる濃度まで、その他の増感物質は最大反応値または log DRC の slope が減小しない濃度範囲内で実験を行なった。

使用した薬物および略号は下記のとおりである。Norepinephrine (norepi), acetylcholine chloride (ACh), tyramine (tyr), cocaine HCl (CCN), tripeleennamine (TRP), N,N-dimethyl-N',N'-dibenzylethylenediamine HCl (TO-I), N¹,N¹-dibenzyl-N²,N²-dimethyl-1,2-propanediamine HCl (TO-II), diphenhydramine HCl (DPH), imipramine HCl (IMP), phentolamine mesylate (PTL), physostigmine salicylate (Es), Dibenamine HCl (DBN). このうち TO-I, TO-II はそれぞれ Fox ら⁵⁾ Kerwin ら⁶⁾ に準じて合成し、その他は市販品を用い、norepi, tyr は当量の HCl, DBN は 0.1N HCl, そのほかの薬物は蒸留水に溶解した stock solution を用時希釈して実験に供した。

結 果

シロネズミ精管の収縮反応

精管の収縮反応の大きさおよび agonist に対する感受性は、ともに睪丸側部が大であった。すなわち、norepi について静止時の長さを等しくとった標本と比較すると、睪丸側部の最大収縮高は精囊側部の 1.5—2 倍であり、 pD_2 はそれぞれ 5.75, 5.35 であった。また ACh 収縮, tyr 収縮においても同様な関係が認められたが、いずれも norepi 収縮に比べて最大反応値が小さく、そのために精囊側部では log DRC を描くことができなかった。

睪丸側部における Norepinephrine 増強作用

CCN, TRP, TO-I は濃度に依存して norepi の log DRC を左に移動させ、また最大反応値を増大させた (Fig. 1, 2). DPH, IMP は精管の感受性を変化させずに反応性を増大させたが、後述するように睪丸側部の norepi 収縮の最大反応値が mechanical limit に近いので反応性増大率が小さく、上記の 5 種の増感物質のうちで最大の増大率を示した TRP でも 1.89 であり、5 種の増感物質の最大増大率の平均は 1.72 ± 0.05 であった。PTL は α 遮断作用によって log DRC を左へ移動させ (1×10^{-8} , 1×10^{-6} M の R 値はそれぞれ 1/1.9, 1/2.1), 反応性の増大作用も弱かった (ρ 値の最大値は 1×10^{-7} M において 1.38). TO-II はいずれの作用も弱かった。

精囊側部における Norepinephrine 増強作用

精囊側部の norepi に対する感受性は、睪丸側部におけると同様に、CCN, TRP および高濃度の TO-I によって増大し (Fig. 1), PTL によって減少した。精囊側部の反応性は IMP を除く増感物質によって大きく増強された (Fig. 3).

睪丸側部における Acetylcholine 増強作用

CCN, TRP, TO-I は睪丸側部の ACh に対する反応性および感受性を増大させた。なかでも TRP の反応性増大作用はいちじるしく、反応性増大作用が極大に達す

Fig. 1. log Dose-Response Curve for Increase in Sensitivity of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine

solid line: epididymal portion
broken line: prostatic portion
symbols used this and following figures
○: cocaine; ●: tripeleennamine;
▲: TO-I; △: TO-II;
■: diphenhydramine; +: imipramine;
□: phentolamine; ◇: physostigmine;
R: equipotent-dose ratio of agonist;
 ρ : increased ratio of maximum response.

5) H.H. Fox, W. Wenner, *J. Org. Chem.*, **16**, 225 (1951).

6) J.F. Kerwin, G.E. Ulliyot, R.C. Fusen, C.L. Zirkle, *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 2962 (1947).

Fig. 2. log Dose-Response Curve for Increase in Maximum Response of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine

Fig. 3. log Dose-Response Curve for Increase in Maximum Response of Prostatic Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine

Fig. 4. log Dose-Response Curve for Increase in Sensitivity of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Acetylcholine

solid line: normal preparation
broken line: vas deferens pretreated with $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ of Dibenamine for 20 min and washed out for 20 min

Fig. 5. log Dose-Response Curve for Increase in Maximum Response of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Acetylcholine

See legend for Fig. 4.

る $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ ではじめて感受性が増大した。PTL は反応性を増大し、感受性を低下させた。TO-II の増感作用は低濃度で認められたが弱かった (Fig. 4, 5). Es は精管の ACh に対する感受性を顕著に増大し、 3×10^{-7} , 1×10^{-6} , $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ でそれぞれ 5.53, 45.1, 341 の R 値を示したが反応性はほとんど変化させなかった (最大増強は $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ で $\rho = 1.48$ (1.17—1.79)).

Dibenamine の Acetylcholine 増強作用に及ぼす効果⁷⁾

ACh 収縮を抑制しない $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ の DBN で 20 min incubate, さらに 20 min 洗浄した睪丸側部では CCN の ACh 感受性増大作用が認められず, PTL が ACh を増強するなど DBN 無処置標本と異なる態度を示した。

7) 紺谷 仁, 五味保男, 日薬理誌, 68, 157 P (1972).

TABLE I. Effect of Cocaine on log Dose-Response Curve of Isolated Vas Deferens (epididymal portion) of Rat to Tyramine

Cocaine (M)	Change in	
	Reactivity (ρ) ^{a)}	Sensitivity (R) ^{b)}
3×10^{-6}	1.64(1.10—1.89)	0.96(0.83—1.11)
3×10^{-5}	2.38(1.27—3.49)	0.92(0.79—1.08)

a) $\frac{\text{max. response to tyramine in the presence of cocaine}}{\text{max. response to tyramine in the absence of cocaine}}$

b) equipotent-dose ratio of tyramine. No. in parentheses are confidence limits ($p=0.05$).

TABLE II. Comparison of Maximum Response of Isolated Vas Deferens (prostatic portion) of Rat to Norepinephrine or Transmural Electrical Stimulation in the Presence and Absence of Diphenhydramine

Stimulation	Concn. of diphenhydramine (M)		
	0	3×10^{-6}	1×10^{-5}
Chemical (norepi 1.6×10^{-3} M)			
cumulative	1.00 ^{a)}	3.64 (2.57—4.71)	4.48 (2.59—6.37)
non-cumulative	1.39 (1.01—1.77)	5.64 (2.84—8.44)	7.65 (3.79—11.3)
Electrical			
transmural	6.16 (3.86—8.64)	7.05 (3.24—10.9)	6.61 (2.73—10.5)

a) relative maximum response. No. in parentheses are confidence limits ($p=0.05$).

しかしこの DBN 処置標本でも TRP, TO-I の ACh 感受性増大作用が認められた (Fig. 4). また反応性増強作用については、低濃度の増感物質の作用が DBN でやや抑制されたが、高濃度の増感物質の作用は PTL がやや抑制されたほかは影響をうけなかった (Fig. 5).

辜丸側部における Cocaine の Tyramine 増強作用

辜丸側部は tyr によって小さいながら再現性のある収縮を呈し、CCN はこの収縮反応の最大反応値のみを増大させた (Table I).

精囊側部の最大反応

本研究を通じて最大反応値の小さな agonist, 標本あるいは部位を用いたときに、増感物質による最大反応値の増大が強くあらわれる傾向が認められた. この事実、精管の収縮に薬理学的限界 (log DRC の最大反応値) と生理学的限界 (mechanical limit) が存在し、増感物質処置によって前者が後者に近づくことを示唆している. そこで反応性増大の顕著な精囊側部を用い、同一標本を norepi の累積および非累積的適用ならびに経壁電気刺激によって収縮させその最大反応値と DPH 適用後の最大反応値の比較を行なって上記の仮説の妥当性を検討した.

その結果、経壁電気刺激で惹起した最大反応値は DPH でほとんど増大しないこと (DPH 3×10^{-6} , 1×10^{-5} M でそれぞれ $\rho=1.14, 1.07$), norepi の非累積的適用による収縮反応の最大値は経壁電気刺激による最大反応値に比べて小さいが DPH 適用によって後者に近づくことから、経壁電気刺激によって惹起される最大反応値は mechanical limit に近いために DPH の最大反応増大作用が顕著にあらわれないのに対し、norepi 単独適用では mechanical limit にまで収縮せず、DPH の共存によってはじめて mechanical limit 近くまで収縮するようになるために DPH の norepi 最大収縮増大作用が顕著に認められることが明らかになった. また別に行なった実験から等張 K^+ による最大収縮反応値が経壁電気刺激の最大反応値にほぼ一致することが示されたことから、 K^+ 収縮の最大反応値もまた mechanical limit に近いことが示唆された.

また本実験によって、norepi 累積的適用時の最大反応値が、非累積的適用時の最大反応値に比べて、DPH の

有無にかかわらず小さいことが示された。その理由は、norepi との接触によって精管が脱感作されるためと考えられるが、詳しい機作の検討は行なわなかった。

考 察

シロネズミ精管の最大収縮反応が増感物質の前処置によって増大する現象は、増感物質の作用機作にとどまらず、精管の収縮機構解明の手掛りとなる可能性を秘めた示唆に富む事実である。Table II に示したように、精囊側部の norepi 収縮はさらに収縮する余地を残しながら最大収縮値に達し、しかも DPH の適用によって mechanical limit にまで収縮するようになる。睪丸側部では ACh 収縮の最大反応値が norepi 収縮の最大反応値より小さいが、増感物質併用によって両者がほぼ同一の最大反応値を示すようになるため、最大反応値増大率 ρ は逆に ACh 収縮において大となる。周知のように平滑筋収縮の最大反応値が agonist ごとに異なることは Stephenson, Ariëns らによって指摘され、それぞれ efficacy,⁸⁾ intrinsic activity⁹⁾ という概念であらわされている。そこで本報のように、異なる標本または異なる agonist に対する増感物質の作用を比較するときは、増感物質による最大反応値増大率が対照の最大反応値に依存した値をとるので、mechanical limit を基準とした log DRC で比較することも必要になってくる。その意味から以下の相関性検討の際には、最大反応値増大率の絶対値よりも相対値に重点をおいて考察する。

CCN の norepi 増強作用が amine 取りこみ機構の抑制に基づくことはすでに定説になっているが、receptor 周辺の agonist の濃度が上昇するだけで最大反応値が増大するとは考え難い。このことは Es が ACh 収縮の最大反応値をほとんど増大させずに感受性を増大したことからも裏付けられ、反応性増大機作としては receptor 周辺の agonist の濃度の増大以外の postjunctional site における機作を考えるべきであろう。Westfall ら¹⁰⁾ は、disulfoton を注射したシロネズミ精管の ACh 収縮の最大反応値が増大していることを認め (ρ 換算で約 1.7)、その機作として auto inhibition からの解放を考えている。本報でも Es $1 \times 10^{-6}M$ で 1.48 倍の最大反応値の増大を認めたが、他の増感物質による ρ 値に比べて小さいこと、ならびに Es を適用しないで ACh の log DRC を繰り返して描いたときの ρ 値が 1.03 (0.83—1.23) を示したことから、Es によるこの程度の ρ 値にはあまり意味をもたせられない。また Westfall らの実験では、cholinesterase 阻害薬適用 24 hr 後の精管を用いているため、この間に何らかの変化が精管に生じた可能性も考えられる。

通常の実験条件のもとで agonist の最大反応値が mechanical limit に達しない理由として、Kasuya ら³⁾ は収縮に参与する Ca^{2+} の不足を考え、CCN による最大反応値の増大は Ca-availability の上昇に基づく現象としている。著者も、¹¹⁾ モルモット摘出精管の norepi 収縮と ACh 収縮を比較した際に、外液 Ca^{2+} を低下させたときの感受性低下が ACh でいちじるしく、しかも低 Ca^{2+} 栄養液中において CCN の増強作用が顕著にあらわれることを認めている。これらの事実を考えあわせれば、シロネズミ精管の示す最大反応値は外液 Ca^{2+} の濃度と agonist の Ca^{2+} 利用効率によって規定され、通常の Tyrode 液 (1.8 mm-Ca) は Ca^{2+} 利用効率の悪い ACh 収縮にとっては相対的に低 Ca^{2+} 状態にあるために最大反応値が小さくしかも増強されやすいということになる。

この点に関連して、シロネズミ精管の収縮反応が部位によって異なることも興味ある知見である。シロネズミ精管は全長 4—5 cm で睪丸側部が細く精囊側部が太い。精管の norepi 収縮の反応性、感受性および CCN, TRP, TO-I の感受性増大効果はいずれも睪丸側部が精囊側部の約 2.5 倍であり (Fig. 1), PTL, IMP の抑制効果は逆に精囊側部でやや強いがその差はいずれも顕著でなかった。これに反し増感物質の norepi 反応性増強作用は両部位でいちじるしく異なってあらわれた。すなわち睪丸側部の反応性増大は増感物質の低濃度で最大に達し、しかもその増強率は精囊側部に比べて小さかった (Fig. 2, 3)。また睪丸側部における ACh 収縮の反応性増大率は精囊側部の norepi 収縮の反応性増大率に相当する値を示した (Fig. 3, 5, 9)。これらの事実を前記の Ca-availability で説明すると、精囊側部および ACh 収縮の Ca^{2+} 利用効率が睪丸側部および norepi 収縮の利用効率に比べて小さいために前者の増強効果がいちじるしく現われるということになる。また同じ現象を収縮の synchronization

8) R.P. Stephenson, *Brit. J. Pharmacol.*, **11**, 379 (1956).

9) E.J. Ariëns, J.M. van Rossum, A.M. Simonis, *Pharmacol. Rev.*, **9**, 218 (1957).

10) D.P. Westfall, J.J. McPhillips, D.J. Foley, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **189**, 493 (1974).

11) 五味保男, 薬物活性シンポジウム, 徳島, 1972 年 10 月.

Fig. 6. Correlation between Increase in Sensitivity (R) and Maximum Response (ρ) of Prostatic Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine

Fig. 7. Correlation between Increase in Sensitivity (R) and Maximum Response (ρ) of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine

Fig. 8. Correlation between Increase in Sensitivity of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Norepinephrine and Acetylcholine

ordinate: increase in sensitivity to norepinephrine
abscissa: increase in sensitivity to acetylcholine

Fig. 9. Correlation between Increase in Maximum Response of Prostatic Portion to Norepinephrine and Epididymal Portion to Acetylcholine

説^{12,13)}に従って、径の太い精囊側部は細胞数が多く synchronization による最大反応値増大を生じる余地を十分に残しているとみなすこともできる。ここではこれらの説の妥当性や収縮に關与する Ca^{2+} の存在部位ならびに増感物質の作用機作についてこれ以上論じることができず、現在検討中であるが、いずれにしてもシロネズミ精管の精囊側部、睪丸側部はそれぞれ norepi 増強作用、ACh 増強作用の研究に適した部位といえることができる。

CCN による norepi 増強の反応性増大機作と感受性増大機作が異なることは、すでに Vohra,¹⁴⁾ Kasuya ら³⁾によって示唆されている。そこで他の増感物質についても検討するために $\log R$ - ρ 相関の検討を行なったところ、精囊側部で CCN, TRP に良好な相関々係が認められ (Fig. 6), また睪丸側部においても、対照の反応性がよいた

12) 粕谷 豊, 後藤勝年, 日薬理誌, **67**, 130 P (1971).

13) D.P. Westfall, D.C. McClure, W.W. Fleming, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **181**, 328 (1972).

14) M.M. Vohra, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **47**, 469 (1969).

めに CCN の低濃度で mechanical limit に達することを考慮すれば、やはり CCN, TRP で相関性があるとみなすことができた (Fig. 7). しかし精囊側部の DPH, TO-II や睪丸側部の DPH, IMP のように反応性を選択的に増大させる増感物質や、TO-I のように低濃度で反応性を増大し高濃度で初めて感受性を増大させる増感物質も存在することから、反応性増大機構と感受性増大機構は別と考える方が妥当であろう。なお TO-II については、TO-I に比べて抑制作用が強く高濃度領域における増感作用が抑制作用で打ち消されるために、それほど大きな増感を生じえないものとみなすことができる。

つぎに増感物質の norepi 増強作用と ACh 増強作用の相関について考察する。Kasuya ら³⁾ は CCN のシロネズミ精管増感作用のうち、norepi に対する感受性増大作用が amine 取りこみ機構の抑制に基づく作用であり、反応性の増大は ACh, angiotensin などに共通してあらわれる非特異的増感作用で外液 Ca^{2+} 濃度の増大に相当する現象と述べている。本報の結果もこの説を支持している。すなわち、睪丸側部の感受性増大作用に関しては CCN のように同一濃度ではほぼ等しい norepi 増強作用と ACh 増強作用を示す増感物質がある反面、TRP は norepi を低濃度で増強し、TO-I, TO-II は ACh を低濃度で増強するなど必ずしも両増強作用が一致していない (Fig. 8). 一方反応性増強作用については norepi 増強作用と ACh 増強作用の間に良好な相関々係があることから、共通の機作によって生じる非特異的増感作用であるという考えを否定することはできない (Fig. 9). この場合、睪丸側部の norepi 収縮は ACh 収縮に比べて大であり、容易に mechanical limit に達し濃度依存性に欠けるので、同一部位で比較するよりは最大反応値の mechanical limit に対する比がほぼ等しい精囊側部の norepi 収縮と睪丸側部の ACh 収縮とで比較する方がよいと考えて Fig. 9 を描いた。

最後に ACh 収縮の感受性増大作用と反応性増大作用との相関について考えてみると、CCN TO-I, TO-II で良好な相関性が認められ、TRP でも slope は異なるもののやはり相関性が認められることから、反応性増大作用

Fig. 10. Correlation between Increase in Sensitivity and Maximum Response of Epididymal Portion of Isolated Vas Deferens of Rat to Acetylcholine

と同一の非特異的な機作によって感受性増大が生じるとも考えられる (Fig. 10). しかし CCN の感受性増大作用のみが選択的に DBN で抑制されることから (Fig. 4), CCN の感受性増大作用は反応性増大作用や TRP, TO-I, TO-II の感受性増大作用とは別の機作に基づくものと結論できる。

かくして本報でとりあげた種々の増感作用は、1) amine 取りこみ機構抑制に基づくと考えられる norepi 感受性増大作用、2) Dibenamine-sensitive な CCN の ACh 感受性増大作用、3) CCN を除く増感物質による ACh 感受性増大と、4) norepi 収縮および ACh 収縮の反応性増大に共通してあらわれる非特異的な作用とにわけられた。しかしこのうち Dibenamine-sensitive な増感作用といわゆる非特異的増感作用の機作は全く不明であり、また CCN を除く増感物質の ACh 感受性増大作用と反応性増大作用の異同を解く手掛りもえられていないので、これらの点に関して現在なお検討中である。