

動物種により異なる腸管におけるヒスタミン応答†

本間知夫**, 伊藤芽依*, 寺島和哉**, 関慎太郎**

Histamine Responses on Gut were different by Animal Species

Tomoo Homma **, Mei Ito *, Kazuya Terashima ** and Shintaro Seki **

In order to study about agonist/antagonist by using acetylcholine (ACh), atropine (Atr), and histamine (His) on excised small intestine, guinea pig has been generally used as experimental animal. The present study measured intestinal contraction by ACh/Atr/His on mice and discussed the possibility of replacement of experimental animal from guinea pigs to mice. Contraction by His on mice could be obtained only at the lower part of mice ileum. So, at the present, it might be not good to use mice for this experiment.

Key words : Guinea pig, Mouse, Intestines, Contraction, Histamine

1 はじめに

生物工学科では、微生物・植物・動物を分子・細胞・組織・個体の様々なレベルで取り扱い、食品や医薬品の開発、健康効果を持つ成分の探索やその利用法の開発、生物の働きを計測・制御する方法の開発など、生物に備わる様々な能力を、有用物質の生産や環境の保全・浄化に役立てるための技術開発を行っている¹⁾。このために必要な基礎的知識、専門的知識、そして実際に実験を行う上で必要な様々な技術は、講義や演習を通じて学び、身に付けさせるようにしている。その中で、動物の解剖や組織を使う動物実験をメインとした生理学実験を2年次の後期の実習の中で実施しており、知識・技術の習得のみならず、動物実験を通じて命の大切さについても学んでもらっている。

生理学実験では、(1)ラットの解剖と各臓器の観察、(2)腸管運動の測定と薬物等の作用、(3)腸管粘膜による糖質消化と糖輸送、(4)各種臓器の組織標本の観察、の各実験を実施しているが、腸管を対象とした実験を組み入れているのは当学科において食品成分の分析や機能性についての実験・研究が行われていることも関係するが、何より食べたもの・飲んだものは腸管において消化・吸収・輸送(運動)されることから、こうした腸管の働きを調べることは我々の身体の中で毎日起こっていることを知ることもつながると考えているからである。

(1)～(3)の実験では実験動物を利用するが、(1)ではラット、(2)ではモルモット、(3)ではマウスを利用している。動物実験はその目的にもよるが一般的にはラットやマウスが使われることが多い。これはラット、マウスが多産で系統が確立されていて実験に必要な数を確保出来ること、様々な疾患モデル、遺伝子改変動物が

作られているため、作用メカニズムの解析などにも有効であるためである。一方モルモットも古くから実験動物として利用されており、特に腸管機能についての生理学的・薬理的な研究では様々な知見が見出され、蓄積されてきたという経緯がある。(2)の腸管運動の実験を紹介している生理学・薬理学の各実習書においても、モルモットが使われている^{2), 3)}。当学科の生理学実験の内容を考える際にもこれら実習書を参考にし、当学科の教育に合うよう内容の一部を変更して、モルモットを使って実験を実施している。基礎的な生理学的事象について実験を通じて確かめるためであれば、モルモットを利用することには何の問題も無いと考える。しかしモルモットはラットやマウスと同じ齧歯類でも草食動物であり、食品・天然物・薬品等の機能性の評価や作用機構の解明を行うにあたり、我々人間への貢献を考えるのであれば、草食動物を使って実験を行うことは果たして適切なのかどうか疑問である。また最近ではモルモットの利用が減り、取扱業者も限られてきたこともあり、1頭あたりの価格が8,000円前後とマウスと比較すると10倍以上になっており、限られた予算の中でモルモットを利用することはなかなか厳しい状況であることも確かである。ただモルモットとマウスでは動物の大きさ、腸管の長さが異なるため、生理学実験では必要最小限の数(1回1匹)で実施出来ている状況であり、(2)の腸管運動の実験についてはモルモットを利用している。しかしモルモットではなくマウスで実験を行うことが出来れば、経費的に助かるし、実験の内容もより納得できるものになる。

そこで本研究では、マウスを使って腸管運動の実験を実施し、モルモットに代えることが出来るか否かについて検討することを目的として実施した。

† 原稿受理 平成28年2月26日 Received February 26, 2016

* 大学院工学研究科生物工学専攻 (Graduate School of Engineering, Division of Biotechnology)

** 生物工学科(Department of Biotechnology)

2 方法

2・1 材料

2・1・1 実験動物及び腸管の摘出

実験動物は、モルモット (Hartley, ♂, 体重 200g) あるいはマウス (ddy, ♂, 5 週齢以降) を、日本 SLC (株) より購入した。動物はイソフルラン麻酔下で開腹し、横隔膜穿孔により安楽死させた後に小腸を摘出した。Krebs 緩衝液 (NaCl 117; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 2.5; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 2.5; Glucose 11.5(mM), pH7.4) を満たしたホールピペットの先端を空腸の口腔端に挿入し、腸内に Krebs 緩衝液を自然落下にて流し込むことで腸管内部を洗浄した。洗浄した摘出腸管は空腸 (上部 2/5) と回腸 (下部 3/5) に分け、混合ガス (95%O₂/5%CO₂) をバブリングした Krebs 緩衝液に実験に使用するまで保存した。なお本実験は、前橋工科大学・動物実験取扱規程の下、動物実験計画承認番号 15-005 および 15-006 において実施された。

2・1・2 試薬

本実験では、摘出腸管の運動 (収縮) を起こすためにアセチルコリン (ACh) 溶液 (Stock:100mM) あるいはヒスタミン (His) 溶液 (Stock:0.03mM) を、ACh による収縮を阻害するためにアンタゴニストであるアトロピン (Atr) 溶液 (Stock:10mM) を使用した。

2・2 摘出腸管運動の観察 (マグヌス法) ⁴⁾

摘出腸管の運動 (小腸平滑筋の収縮・弛緩の様子) の観察はマグヌス法にて行った。すなわち、摘出腸管を 2~3cm に切り出し、Krebs 緩衝液 20mL を入れたマグヌス管内にセットした。セットした摘出腸管の一端をトランスデューサーに接続し、摘出腸管の収縮・弛緩による変化を検出し、その様子を記録計に記録した (Fig.1)。なお、生理学実験で学生が実験を行う場合、マグヌス管内はエアポンプで空気を送り込んでいるが、本来は組織の生存のためには空気よりも混合ガスを使うべきである。本実験ではモルモットは生理学実験の結果を利用することとしたが、マウスの場合には混合ガスを利用した。

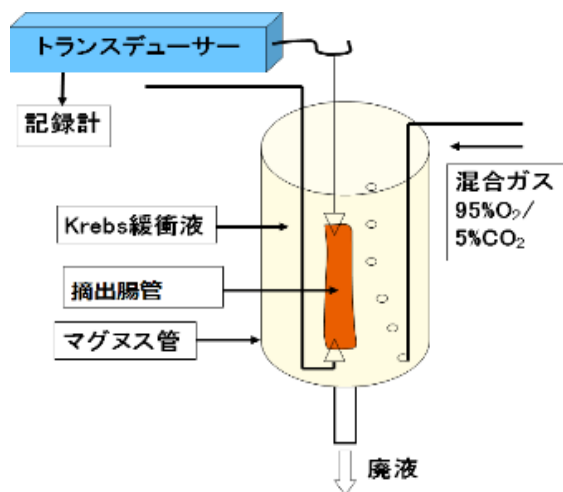


Fig.1 Schematic illustration of the Magnus method

2・3 各種薬物投与による摘出腸管運動の観察

本実験では、腸管の運動機構、アゴニストおよびアンタゴニストの関係、拮抗作用などについて学んでもらうべく、各種薬物を以下に示す順番で摘出腸管に投与し、摘出腸管の運動がどのような影響を受けるか観察を行った。なお、以下の一連の実験は同じ摘出腸管を使って実施し、最後まで終わったら新しい摘出腸管に交換し、再び同じ手順で実験を実施した。

2・3・1 ACh 投与による摘出腸管運動の観察

マグヌス管にセットした摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、ACh 溶液をマグヌス管内に投与し、摘出腸管の収縮を観察した。この時、セットした摘出腸管の長さや摘出腸管へのテンションのかけ方、また記録計の感度によっては、記録計における収縮の記録が振り切れてしまうことがあったので、収縮の様子が記録時に振り切れないように上記条件を細かく調整したり、ACh 溶液の作用濃度を薄くしたりすることで対応した。そのため、モルモットの場合、マウスの場合で ACh の作用濃度が異なる場合があった。ACh 投与による摘出腸管の収縮が一定になったところでマグヌス管内の緩衝液を排出し、同じ緩衝液で 3 回摘出腸管を洗浄した。その後、摘出腸管が弛緩して元に戻り、運動が再び安定したことを確認したら次の操作を実施した。

2・3・2 Atr の ACh 収縮に対する作用

摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、Atr をマグヌス管内に投与した (作用濃度 0.03μM)。この時、ベースラインの低下 (弛緩) が見られることがあったのでベースラインが安定するまで経過を見た後、ACh を添加して摘出腸管の収縮を観察した。その後摘出腸管を緩衝液で 8 回洗浄し (Atr 使用後は何度も洗浄しないと元に戻らない (弛緩しない) ため)、摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、再び同じ作用濃度で ACh を投与して摘出腸管の収縮を観察した。その後摘出腸管を緩衝液で 3 回洗浄し、摘出腸管の運動が再び安定したことを確認したら次の操作を実施した。

2・3・3 His 投与による摘出腸管運動の観察

摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、His をマグヌス管内に投与して摘出腸管の運動を観察した (作用濃度 10μM)。その後摘出腸管を緩衝液で 8 回洗浄し (His は残存しやすいため)、摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、初めと同じ作用濃度の ACh を投与して摘出腸管の収縮を観察した。その後摘出腸管を緩衝液で 3 回洗浄し、摘出腸管の運動が再び安定したことを確認したら次の操作を実施した。

2・3・4 Atr の His 収縮に対する作用

摘出腸管の運動が安定したと思われたところで、Atr をマグヌス管内に投与した (作用濃度 0.03μM)。この時、ベースラインの低下 (弛緩) が見られることがあったのでベースラインが安定するまで経過を見た後、His を投与して摘出腸管の収縮を確認した (作用濃度 10μM)。

3 結果 および 考察

3・1 モルモット摘出腸管における各種薬物投与の影響

ACh, Atr, His の投与が摘出腸管の運動に対してどのように作用したか、その一連の結果の一例を Fig.2 および Fig.3 に示した。

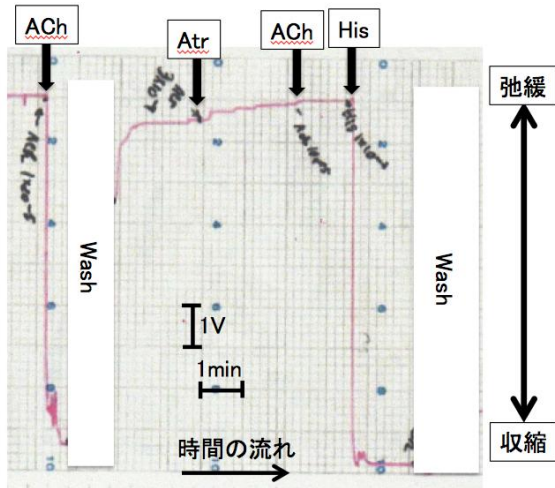


Fig.2 Contractions of guinea pig's small intestine by ACh and His applications (1)

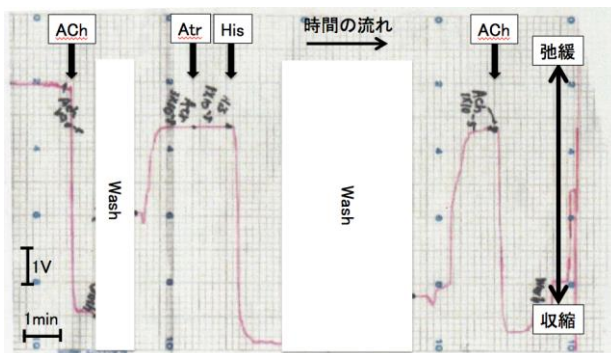


Fig.3 Contractions of guinea pig's small intestine by ACh and His applications (2)

Fig.2の結果について見ていくと,ACh投与によりモルモット摘出腸管(小腸)は直ちに収縮した. 摘出腸管を洗浄後, Atr を投与すると若干の弛緩が見られた. そのまま Atr 存在下で ACh を投与しても摘出腸管の収縮は見られなくなった. Atr は ACh 受容体のアンタゴニストとして知られており, 競合的に ACh 受容体に結合する. そのため, Atr 存在下で ACh を投与しても ACh が受容体に結合できないために摘出腸管の収縮は起こらない(濃度に依り変わってくるが). 次に, 本来であれば一度摘出腸管を洗浄するのだが, 学生に実験を行わせているためにその時々で分かりやすいよう対応を変える場合があり, この場合は洗浄せずにそのまま His を投与したところ, 直ちに摘出腸管は収縮した. 学生に対しては Atr 存在下で ACh による収縮が見られなかった原因として,

上述したような Atr による競合的障害が起きていることが分かっているが, それが分かっていない学生もおり, Atr が腸管平滑筋に対して何かダメージを与えてしまい, そのために ACh を投与しても収縮が見られなかった可能性も考えられるのではないかと説明をした. しかし His 投与によって直ちに摘出腸管が収縮したということは, 腸管(平滑筋)そのものは収縮出来る状態にあること, すなわち Atr によりダメージを受けた訳ではないことがこの実験で理解出来る訳である.

Fig.3は,AtrがAChのアンタゴニストであるがHisのアンタゴニストではないことを確認させるために実施した結果である. すなわち Atr 存在下で His を投与しても直ちに摘出腸管は収縮したことから,His が作用する部位(受容体)に Atr は作用しないことが確認出来た訳である. そして最後に ACh を投与することで依然として摘出腸管が大きく収縮することを観察することによって,ACh,Atr,His の結合が非可逆的なものではなく,投与・洗浄によって可逆的に起こることが確認出来る訳である.

3・2 マウス摘出腸管における各種薬物投与の影響

モルモット摘出腸管で見られたような ACh, Atr, His の投与による腸管運動が, マウス摘出腸管においても同様に観察出来るかどうかを調べた. 結果の一例を Figs.4 ~6 に示した. Fig.4 は空腸, Fig.5 および Fig.6 は回腸下部における結果である.

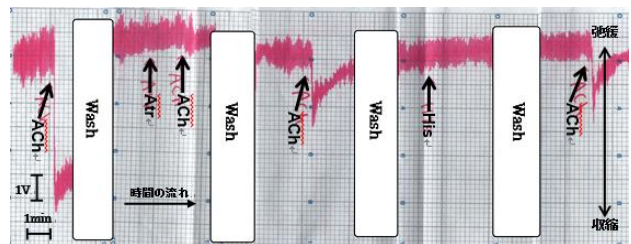


Fig.4 Contractions of mice's jejunum by ACh and His applications

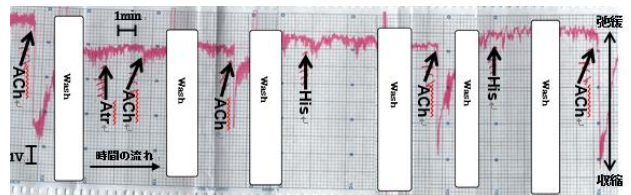


Fig.5 Contractions of mice's lower part of ileum by ACh and His applications (1)

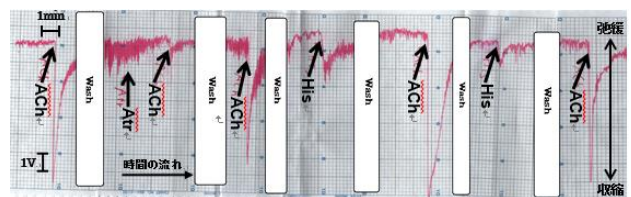


Fig.6 Contractions of mice's lower part of ileum by ACh and His applications (2)

いずれの摘出腸管部位においても、AChによる摘出腸管の収縮、Atr存在下でのAChによる収縮の抑制、そして摘出腸管洗浄後の再度のAChによる収縮が見られた。次いでHisを投与したところ、空腸(Fig.4)および回腸上部・中部では摘出腸管の収縮は観察出来なかった。しかし回腸下部では、AChによる収縮ほどの大きさではなかったが、Hisによる摘出腸管の収縮が観察された(Figs.5&6)。Hisの作用濃度をさらに上げてこの傾向は変わらなかった。

生理学実験の実施において、上述したようにアゴニスト・アンタゴニストの関係を学ぶためにAChとAtrを利用することはマウス摘出腸管でも可能であることが分かった。しかしHisによる収縮が回腸下部でのみわずかな大きさでしか観察出来ないという結果は、実験動物をマウスに代えても必要とする結果が一部でしか得られないことを意味する。使用動物数を最小限に抑えること、得られる知見・観察結果の充分さを考えると、腸管運動の実験については今のところはやはりモルモットを使わざるを得ないという結論にせざるを得ない。

His投与による摘出腸管の収縮について、このように動物種の違いでこうも大きくその反応性が異なる点について最後に考察する。Hisはヒスタミン受容体、特にH1受容体に結合・作用する。モルモットとマウスではこのH1受容体の腸管における分布に差があるのではないかと考えられるが、文献検索を行っても直接的に両者の違いを示す文献を探し出すことが出来ていない。しかし動物種の違いにより腸管における薬物感受性の違いを比較した報告がいくつか見つかかり、Hisによる腸管収縮がラットやマウスでは弱いあるいは見られないことが記載されていた^{5),6),7)}。すなわち、動物種の違いによるHis収縮の違いの要因についてはまだ明らかになっていない部分があると思われるが、現象としては既に知られていたことが分かった。しかし教科書的にはこうした動物種の違いによる反応性の違いなどが詳細に明記されている訳ではなく、一般的な現象として書かれてしまっている。マウスでも同じように応答が得られるだろうと考えて実験を実施してみても、教科書通りの結果が得られないということが起こり得る訳であり、実験を通して生理学の知識の理解を深めようとしても、やみくもに実施すればよい訳ではないことが今回の摘出腸管の収縮実験を通じて分かった。

今後はこの動物種の違いによるH1受容体の分布の違いを調べるといった研究を行うことは、比較動物学的には意味があるかもしれないが、果たしてそこまでやる必要があるのかどうかは考えどころである。

参考文献

- 1) 公立大学法人 前橋工科大学 2016 大学案内「生物工学科」 p.18.
- 2) 実験 1 摘出モルモット回腸に対する薬物の作用—マグヌス法、「基礎薬理学実験」久保田和彦他 3名編集(1987), 南江堂, p.85-91.

- 3) 5-3 消化管運動 B:自律神経支配の影響,「新訂 生理学実習書」日本生理学会教育委員会監修(2013), 南江堂, p.102-105.
- 4) 本間知夫, 生理学実験(2) 腸管運動の測定と薬物等の作用, 「前橋工科大学工学部生物工学科 平成 27 年度生物学実験 II <生理学実験>実験テキスト(2015)
- 5) 鶴見介登, 早野さつき, 長谷川順一, 藤村一, 日薬理誌, **75**, 309-314 (1979).
- 6) 清水一政, 中條眞二郎, 浦川紀元, 日平滑筋誌, **18**, 93-103 (1982).
- 7) S.Singh and M.B.Mandal, *Indian J.Physiol.Pharmacol.*, **57**, 104-113 (2013).