

〔原著〕

ラット咬筋の基礎血流調節に対するサブスタンスPの作用

新岡 丈治¹⁾, 石井 久淑²⁾

1) 北海道医療大学薬学部/大学教育開発センター

2) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野

Effects of substance P on basal blood flow regulation in rat masseter muscle

Takeharu NIIOKA¹⁾ and Hisayoshi ISHII²⁾

1) School of Pharmaceutical Sciences/Center for Development in Higher Education, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

2) Division of Physiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

Abstract

The present study investigated the suppressive effect of the selective substance P-receptor antagonist, spantide I, on the resting blood flow in the rat masseter muscle with the aid of a laser speckle imaging flowmeter to confirm the presence of dilator tone at the resting state. The effects of inhibition of the resting blood flow by application of spantide I on vasodilatation evoked by activation of the parasympathetic vasodilator fiber and intravenous administration of acetylcholine were also investigated.

The resting blood flow in the masseter muscle was significantly reduced by the application of spantide I in a dose-dependent manner. The blood flow was recov-

ered 60 min after washing with spantide I. After application of spantide I, the blood flow increases evoked by activation of the parasympathetic vasodilator fiber and administration of acetylcholine were significantly inhibited when compared with those of the non-treated control.

These results suggest that substance P induces dilatory tone via its receptor in the vessels of the rat masseter muscle at the resting state. If the dilator tone decreases, vascular beds may constrict excessively by their own elasticity and/or contractile tone, and a subsequent vasodilatory responses may be suppressed.

Key words : Rat, Masseter muscle, Basal blood flow, Substance P

緒 論

咬筋は咀嚼、嚥下および発声などの複雑な運動に関わる骨格筋であり、体幹・四肢の骨格筋に比べて疲労しにくいなどの特徴をもつ (van Steenberghe et al., 1978; Jow & Clark, 1989). この様な骨格筋の運動や疲労には、酸素、栄養素や代謝産物の運搬や交換を担う血流の動態が密接に関わっている (Guyton & Hall, 2006).

我々はこれまで、咬筋の血流動態とその調節機序を明

らかにする目的で様々な研究を行ってきた (Ishii et al., 2005, 2007, 2009a, b, 2010, 2011; Ishii & Izumi, 2012).

また近年では、特定範囲の血流動態を二次元の経時的な画像データを元に解析することが可能なレーザースペックルイメージング血流計を用いた実験により、浅部咬筋表面における定常状態の基礎血流の分布と、交感神経性ならびに副交感神経性に血管が収縮・弛緩反応を示したときの血流動態変化を報告した (Niioka et al., 2009b).

この報告の中で、基礎血流量が少ない部位では基礎血流

受付：平成25年3月27日 受理：平成25年4月30日

量が多い部位に比べてより大きな血流増加反応が認められ、また一方で、基礎血流量が多い部位では、より大きな血流減少反応が認められた。これらの結果は、咬筋血管の収縮・弛緩反応には、基礎血流量すなわち定常状態における血管壁のトーン調節状態が影響を及ぼすことを示唆している。同様の結果・示唆はネコの口唇血流についても報告されている (Karita & Izumi, 1995)。

全身に分布する血管の基礎血流には、交感神経性血管収縮線維の活動レベルに依存する収縮性トーン調節が重要であることが広く認識されているが (Barcroft et al., 1943), それに対して本研究を行う中で、サブスタンスP受容体の選択的阻害薬であるspantide Iを筋腹中に投与すると、咬筋表面を走行する血管や筋腹中の定常状態における基礎血流が減少することを見いだした。この結果は、咬筋中の血管壁は、サブスタンスP受容体を介したメカニズムによって、定常状態でも拡張性にトーン調節を受けている事を示唆する。すなわち基礎血流調節には、収縮性トーン調節に加えて、拡張性トーン調節系が存在する事が考えられる。しかしながら、血管壁の拡張性トーン調節系に対する報告は少なく統一した見解はない。

本研究では、咬筋血管に対する拡張性トーン調節系の有無を明らかにする目的で、spantide Iの基礎血流に対する抑制作用を調べ、さらに基礎血流が抑制された状態が、神経刺激や薬物によって誘発される血管拡張反応に及ぼす影響を調べた。我々の近年の報告 (Niioka et al., 2009b) で示される様に、咬筋表層における血流分布は一定ではない。例えば、咬筋組織に血液を供給している血管部位 (咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝) では、定常状態でも常に一定以上の血流値が認められるし、咬筋筋腹においては一定以上の血流値を示す部位もあれば、きわめて低い血流値を示す部位もある。この様に多様な血流分布を示す咬筋表層の血流動態を効率良く観察・解析するために本研究でも血流測定にレーザースペックルイメージング血流計を採用し、基礎血流値が高い咬筋動脈と基礎血流値が低い筋腹中央部に対する解析を行った。

方 法

1. 実験動物

本研究は、北海道医療大学動物実験規定に基づき、北海道医療大学動物実験センター管理運営委員会の審査、並びに学長の承認を得て行った。実験には、Wistar系の雄性ラット (325~485 g) を用いた。ラットは、ワイヤーケージに入れ、昼夜12時間サイクルの環境下、水と固形飼料は随時与えた状態で飼育した。エーテルで沈静

化した後、ウレタン (1 g/kg, Sigma) を頸背部に皮下注射することで麻酔をかけた。大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入し、それぞれから血圧測定と薬物の静脈注入を行った。血圧は、圧トランスデューサー (AP-601G, 日本光電) を介して得られた電圧変化をレコーダー (NR-500/NR-TH08, キーエンス) で記録した。ミオブロック (0.6 mg/kg, シスメックス・ピオメリュー) の静脈注入により筋弛緩させた後、継続的な人工呼吸下 (酸素50%, 空気50%) で実験を行った。左側頰の皮膚を切開・除去し、咬筋筋腹ならびに周辺組織を露出させ、組織表面を乾燥させないように、咬筋表面には適宜流動パラフィン (和光純薬) を滴下させた。実験終了後は、ソムノペンチル (共立製薬) の過量投与 (100 mg/kg以上) によりラットを安楽死させた。

生体は、温度刺激、光、空気の対流による刺激や代謝活動に伴う生体内からの様々な刺激などを常に受容し、それに応じた生体反応を行っている。つまり、厳密には定常状態であるとは言い難いが、本研究では、ウレタン麻酔したラットに上述した通りの処理を行い、人工呼吸下で維持した状態で、特別な薬物刺激や電気刺激を行っていない状態を「定常状態」と表現した。

2. 舌神経の電気刺激

咬筋の副交感神経性血管拡張反応は、三叉神経 (舌神経) の電気刺激による反射法 (Izumi & Karita, 1992, 1993; Ishii et al., 2005, 2009b; Niioka et al., 2009a) で誘発させた。舌神経は、末梢側を切断したうえで両極性の電極を用いて中枢性に刺激した。刺激には電気刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) を用い、2 ms間隔の矩形波にて、強度20 V、周波数20 Hzで20秒間刺激した。この刺激条件では、最大限の血管拡張反応が誘発されることを過去に報告している (Ishii et al., 2005)。

3. 咬筋血流の測定

3-1. 共通操作

ラット左側咬筋の血流は、レーザースペックルイメージング血流計 (OMEGAZONE OZ-01, Omegawave) を用いて観察した。露出させた咬筋筋腹表層をCCDカメラで観察し、8 bitスケールのモノクロ実像とスペックル画像を2秒間隔で、1つの実験当たり4分間記録した。スペックル画像の処理や解析は、Image J (National Institutes of Health) を用いて行い、任意に設定した観察範囲 (それぞれの図を参照) に含まれる個々の画素が示す輝度の値の平均を血流値とした。

3-2. 定常状態の咬筋血流に対するspantide Iの効果

麻酔・人工呼吸下で維持したラットの咬筋筋腹中央部に、生理食塩水（大塚製薬）ならびにspantide I（1, 3, 10, 30, 100 μ M, ペプチド研究所）を投与（20 μ L, im）した。我々が行った予備実験において、spantide Iは本研究で用いた濃度を大腿静脈に挿入したカニューレから静脈内に注入しても効果を示さなかった。ラットを用いた他の報告でも、spantide Iを静脈内投与では用いていない（Zochodne & Ho, 1991; Anderson et al., 2006）。本研究では、spantide Iを筋肉内投与した。血流記録は、生理食塩水および各濃度のspantide Iを投与した10分後から行った。Spantide I（100 μ M）投与後の血流測定を行った後に、生理食塩水でspantide Iを洗浄し、その60分後に改めて血流記録を行った。生理食塩水による洗浄は、27ゲージの注射針を筋腹に対して水平方向に、筋腹を貫通させる様に刺入した後、針の先端が筋腹中に留まる程度まで引き戻し、およそ1 mLの生理食塩水を注入・漏出させることで行った。この操作は、定常状態の基礎血流量ならびに、神経刺激や薬物投与によって誘発される血流増加反応に影響しなかった。Spantide Iの投与ならびに洗浄は、以下に記す実験系でも同様の操作で行った。

3-3. サブスタンスPによって誘発される咬筋の血流増加反応とそれに対するspantide Iの抑制作用

麻酔・人工呼吸下で維持したラットに生理食塩水ならびにサブスタンスP（0.1, 0.3, 1, 3 μ g/kg, ペプチド研究所）を投与した。生理食塩水ならびにサブスタンスPは、血流の記録開始30秒後に大腿静脈に挿入したカニューレから投与した。また、spantide I（100 μ M）の投与10分後にもサブスタンスP（3 μ g/kg）を投与し、その時の血流変化を記録した。

3-4. 副交感神経性血管拡張反応に対する、spantide Iの影響

麻酔・人工呼吸下で維持したラットの咬筋筋腹中に、生理食塩水ならびにspantide I（1, 3, 10, 30, 100 μ M）を投与した後、副交感神経性血管拡張反応を誘発させた。副交感神経血管拡張線維を活性化させるための舌神経刺激は、血流記録開始30秒後に行った。またspantide I洗浄60分後にも副交感神経性血管拡張反応を誘発させ、血流変化を記録した。

3-5. アセチルコリンによる血流増加反応とそこに対するspantide Iの影響

生理食塩水ならびにspantide I（100 μ M）を投与したラット群に対してアセチルコリン（100 ng/kg, Sigma）を大腿静脈に挿入したカニューレから投与し、その時の血流変化を記録した。アセチルコリンは、血流記録開始30秒後に投与した。血流記録は、生理食塩水ならびにspantide Iを投与した10分後から行った。

4. 統計解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差で示した。平均値の差の検定は、2群間の比較ではt検定を行い、他群間の比較では、はじめに分散分析を行い、有意差が認められた際には、その後にDunnnett'sテストを行った。危険率が5%未満となる結果が得られた際に有意差があると判断した。統計解析には、SPSS Statics20（日本IBM）を用いた。

結 果

1. ラット咬筋表面の実像とスペックル画像

ラット左側咬筋表面の観察で得られた実像とスペックル画像を図1に示した。模式図（図1A）で示されるラットの左側咬筋を観察した視野中には咬筋筋腹、咬筋表面を走行する顔面神経束ならびに涙腺が観察された。実像中では、咬筋表層を走行する顔面神経束が高輝度で観察されたのに対して（図1B）、スペックル画像中では顔面神経に沿って走行する神経栄養血管が高輝度で観察された。また咬筋に酸素や栄養素を供給する咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝ならびにそれらの分岐血管が高輝度で鮮明に観察された（図1C）。

2. 定常状態の基礎血流に対するspantide Iの抑制効果

Spantide Iの投与（1, 3, 10, 30, 100 μ M）は、濃度依存的に咬筋における定常状態の基礎血流量を低下させた。定常状態の血流値は、咬筋動脈では30 μ M以上、筋腹中央部では100 μ Mの投与時に、Salineのみを投与したControlと比較して有意に低値を示した（図2B）。特に咬筋動脈においては、100 μ Mのspantide I投与によって、スペックル画像中に認められる血管の像が消失するレベルまで血流の低下が認められた（図2A）。Spantide Iの投与により低下した咬筋血流は、spantide I洗浄後60分にはcontrolレベルまで回復した。

3. サブスタンスPの静脈内投与によって誘発される咬筋の血流増加反応とspantide Iによるその抑制

サブスタンスPの静脈内投与によって誘発される血流増加反応の様子を図3に示した。サブスタンスPの静脈内投与（0.1, 0.3, 1, 3 μ g/kg）は、咬筋表面を走行する血管、ならびに咬筋筋腹の両者に対して濃度依存的

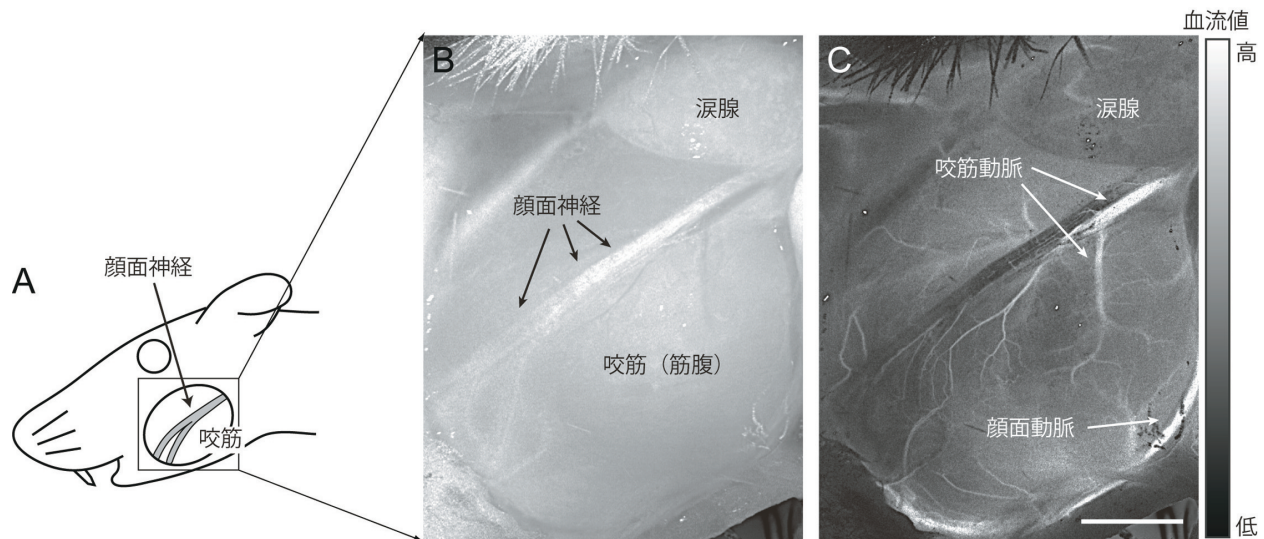


図1 ラット左側咬筋表層の実像とスペックル画像
A. ラット頭部の模式図 B. ラット咬筋表層の実像. C. ラット咬筋表層のスペックル画像. スケールは1 cm.

な血流増加反応を誘発した. その血流増加反応の血流変化量は, $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上のサブスタンスP投与で, Salineのみを投与したControlと比較して有意に大きな値を示した(図3C). ラットの平均血圧は, 定常状態では $148.0 \pm 8.0 \text{ mmHg}$ で維持されていた ($n = 5$). 各濃度のサブスタンスPの静脈内投与は, 投与直後からおよそ20秒間に渡って僅かに血圧を低下させる傾向が見られた(平均血圧の変化量: Saline, $11.6 \pm 2.62 \text{ mmHg}$; $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $20.98 \pm 3.36 \text{ mmHg}$; $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$, $20.63 \pm 3.27 \text{ mmHg}$; $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, $21.47 \pm 2.64 \text{ mmHg}$; $3 \mu\text{g}/\text{kg}$, $23.92 \pm 1.61 \text{ mmHg}$). 各濃度のサブスタンスP投与に伴う平均血圧の変化量にサブスタンスPの濃度依存性は認められなかった, また, Salineのみを投与したcontrolと比較して有意な差も認められなかった. Spantide Iの投与 ($100 \mu\text{M}$)は, サブスタンスP ($3 \mu\text{g}/\text{kg}$)の投与によって誘発される血流増加反応を有意に抑制した(図3C).

4. 咬筋の血流増加反応に対する基礎血流抑制の影響

三叉神経(舌神経)の電気刺激によって反射的に誘発される咬筋の副交感神経性血管拡張反応は, spantide Iの投与による濃度依存的な基礎血流量の低下に伴って抑制された(図4). 咬筋動脈では $30 \mu\text{M}$ 以上のspantide Iを投与した時に, 筋腹中央部では $10 \mu\text{M}$ のspantide Iを投与して基礎血流を低下させた時に有意な血流増加反応の抑制が認められた(図4B).

またSpantide I ($100 \mu\text{M}$)の投与で基礎血流を低下させた状態では, アセチルコリン ($100 \text{ ng}/\text{kg}$)の静脈内投与によって誘発される血流増加反応も有意に抑制された(図5).

考 察

本研究では, 咬筋血管に対する拡張性トーン調節系の有無とそこに関わるサブスタンスPの役割を明らかにする目的で, サブスタンスP受容体選択的阻害薬であるspantide Iの基礎血流に対する抑制作用を調べ, さらに基礎血流が抑制された状態が, 神経刺激や薬物によって誘発される血管拡張反応に及ぼす影響を検討した.

浅部咬筋表層の血流観察には, レーザースペックルイメージング血流計を用いた. 得られたスペックル画像中では血流が豊富な部位ならびに流速が大きい部位が高輝度で表現されるため, 咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝をそれらの細かな分岐に至るまで鮮明に検出することができた(図1). また筋腹部では, 筋腹の部位毎に血流動態が異なる様子も観察することができた(図2, 3). 単一血管ではなく, 咬筋表層の様に血管の分布や血流動態が多様な部位を観察するのに, レーザースペックルイメージング血流計は, 最も有用なツールの1つであるといえる.

定常状態の基礎血流調節には, 全身の血管に分布する交感神経血管収縮線維が関与することが広く認識されており, 骨格筋の血管においても交感神経血管収縮線維は, 自発的に一定レベルのパルスを発生していて, 終末から遊離されるノルアドレナリンを介して血管壁に対して収縮性にトーン調節を行っていることが確認されている(Barcroft et al., 1943; Laverty, 1962; Hagbarth & Vallbo, 1968). また骨格筋の血管壁には, 交感神経血管拡張線維の支配も確認されているが(Bulbring & Burn, 1935; Joyner & Dietz, 2003), 交感神経系の自発的なパルスは殆どが収縮性トーン調節に関与することが示唆され

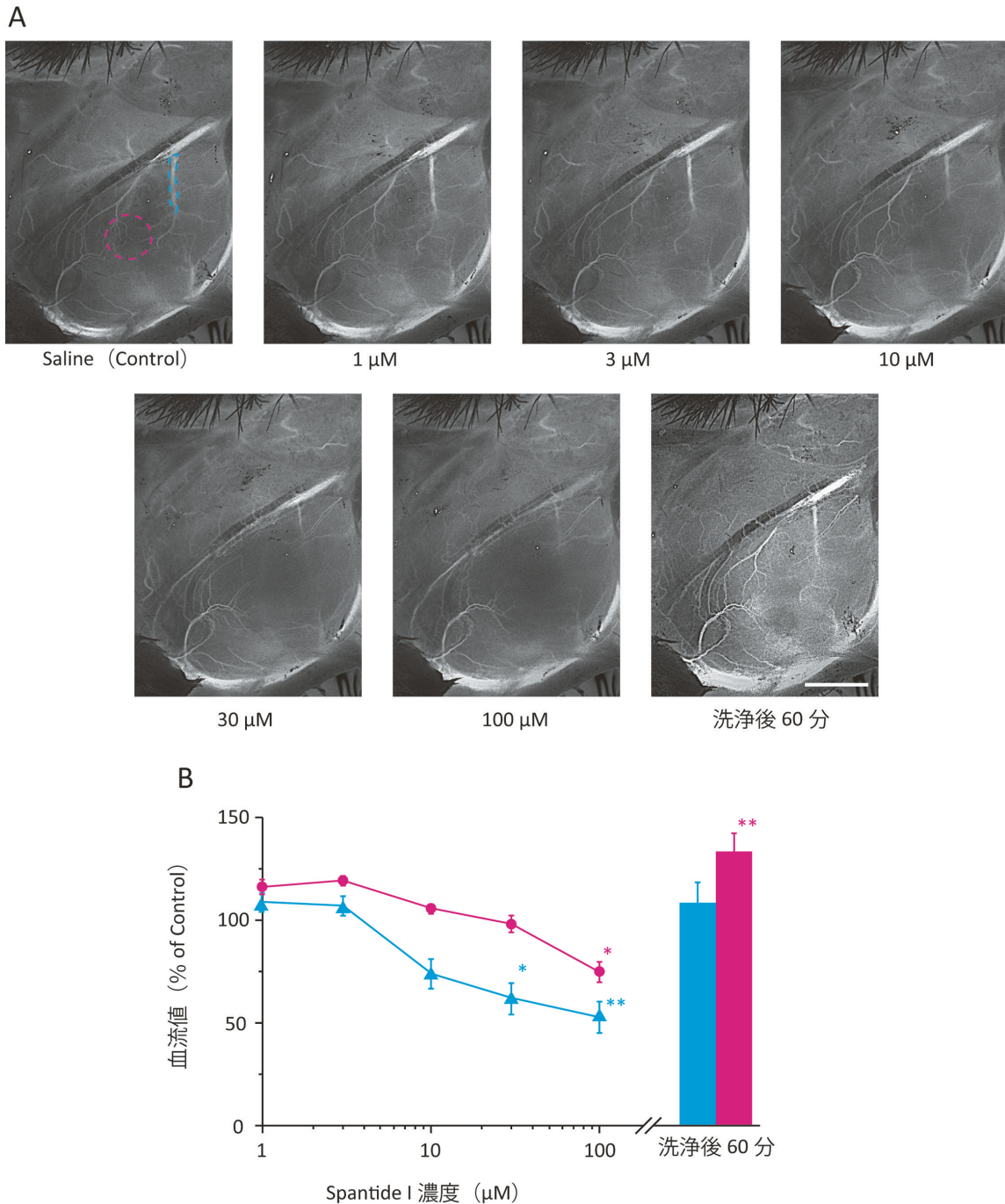


図2 Spantide Iによる基礎血流の抑制

A. 生理食塩水ならびにSpantide I (1, 3, 10, 30, 100 μM) を咬筋に投与した10分後のスペckル画像, ならびにspantide I 洗浄60分後のスペckル画像. ピンクならびに水色の点線は, 筋腹および咬筋動脈の分岐における血流値の測定範囲を示す. スケールは1 cm. B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (水色), ならびに筋腹中央部 (ピンク色) の血流値をまとめたグラフ. グラフの縦軸 (血流値) は, control実験の基礎血流値の平均値に対する百分率で示した. 例数は4. *および**は, それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrolの血流値に対して有意差が有ることを示す.

ている (Hagbarth & Vallbo, 1968; Delius et al., 1972). 本研究では, サブスタンスP受容体の選択的阻害薬であるspantide Iを咬筋に投与すると, 投与部位周辺の血流がspantide Iの濃度に依存して有意に抑制されることを示した (図2). またサブスタンスPによって誘発される咬筋血流の増加反応もspantide Iにより有意に抑制された (図3). これらの結果から, 咬筋の血管壁にはサブスタ

ンスP受容体が存在し, この受容体を介して血管が拡張性の調節を受けること, 特に定常状態でも血管壁に対するサブスタンスPを介した拡張性調節系が存在する事が示唆された. サブスタンスPの選択的阻害薬による基礎血流の抑制は, ラットの坐骨神経栄養血管 (Zochodne & Ho, 1991, 1993) やフェレットの歯肉血管 (Berggreen & Heyeraas, 1999, 2000) でも報告されているため, これ

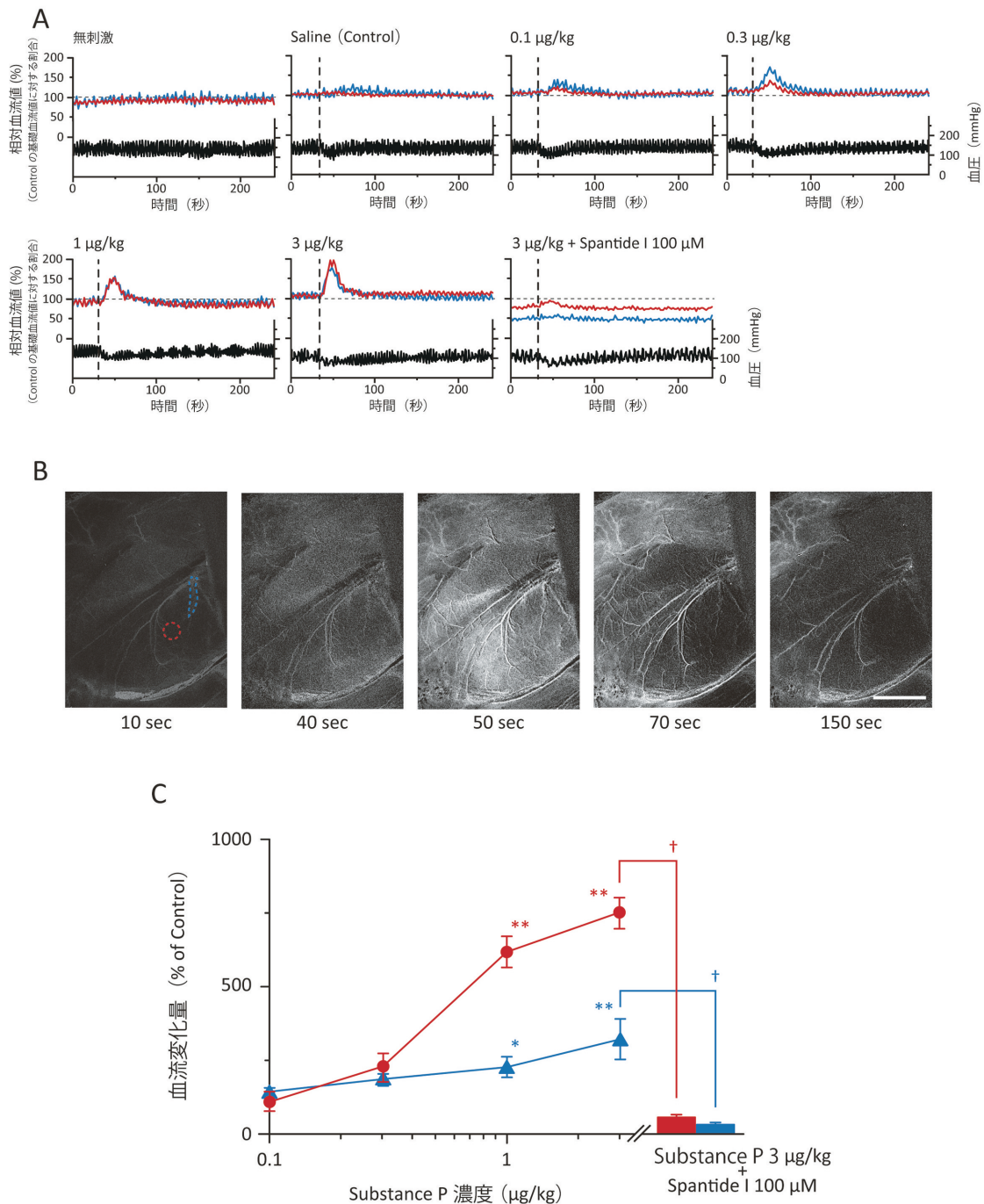


図3 サブスタンスPによる血流増加反応

A. 生理食塩水ならびにサブスタンスP (0.1, 0.3, 1, 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を静脈内投与したとき, ならびにspantide I (100 μM) 投与後にサブスタンスP (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与したときの咬筋の血流変化 (咬筋動脈の分岐: 青色と筋腹中央部: 赤色) と血圧変化の典型例. サブスタンスPを投与した時点を点線で示した. 血流変化の縦軸 (相対血流値) は, control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した. B. サブスタンスP (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与した際に認められる血流変化の経時変化画像 (スペックル画像). 赤ならびに青色の点線は, 筋腹および咬筋動脈の分岐における血流値の測定範囲を示す. スケールは1 cm. C. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (青色), ならびに筋腹中央部 (赤色) の血流変化量をまとめたグラフ. 縦軸 (血流変化量) は, control実験の30~50秒間における血流変化量に対する百分率で示した. 例数は6. *および**は, それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す. †は危険率 $P < 0.001$ で有意差が有ることを示す.

らの報告も我々の仮説を支持する.

サブスタンスPは, 全身に広く存在する求心性一次ニューロン (A δ 線維ならびにC線維) に多く分布することが報告されている (Bevan & Brayden, 1987). 同様に咬

筋由来の求心性一次ニューロンの細胞体が存在する三叉神経節でも豊富なサブスタンスP免疫陽性反応が確認されている (Champlin et al., 1991). すなわち, 咬筋の定常状態における拡張性血管トーン調節に関するサブス

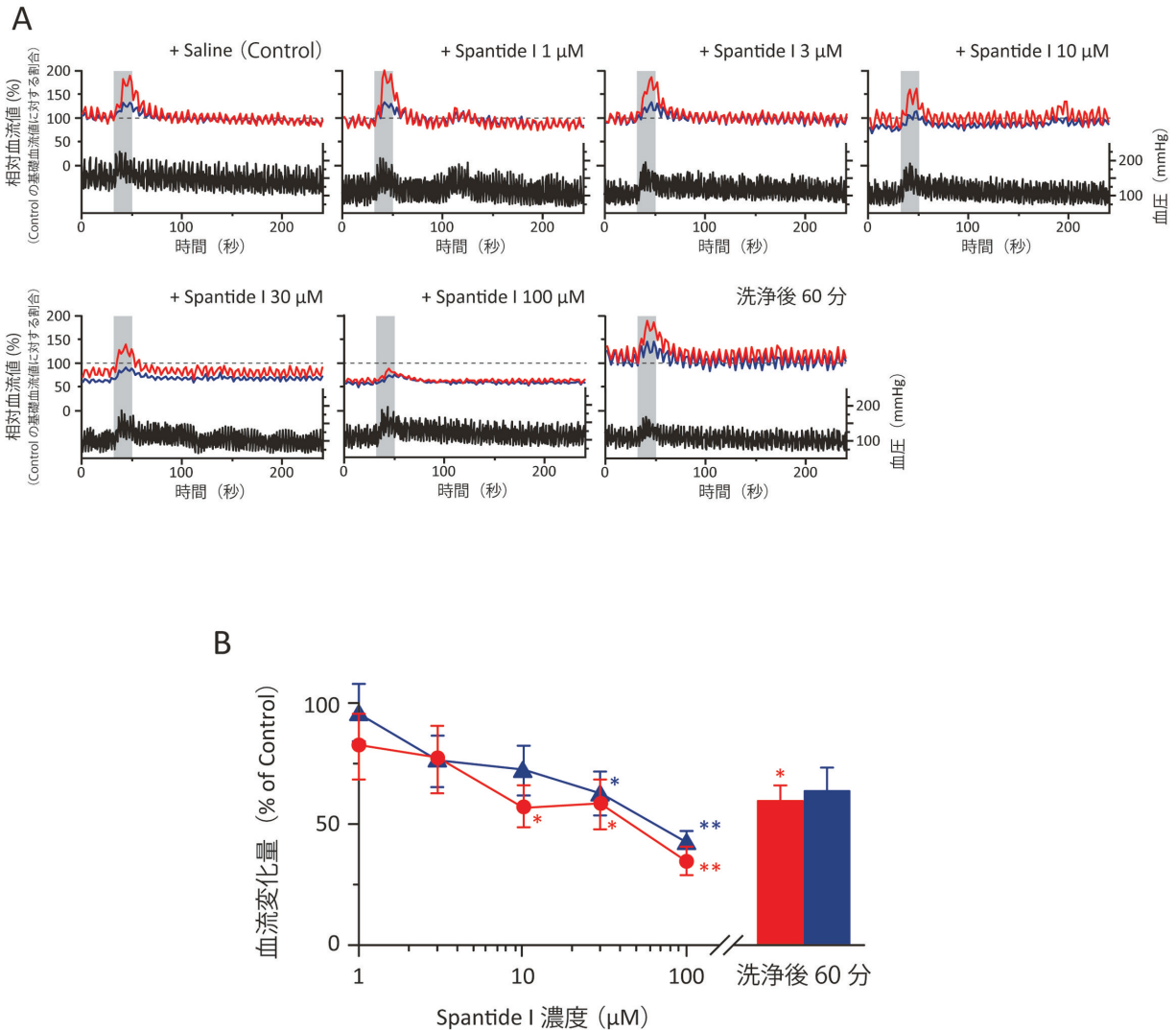


図4 Spantide Iの前処理が、咬筋の副交感神経性血管拡張反応に及ぼす影響
 A. 生理食塩水ならびにSpantide I (1, 3, 10, 30, 100 μM) を投与した10分後、ならびにspantide Iを洗浄した60分後に副交感神経血管拡張線維を活性化させたときの咬筋の血流変化（咬筋動脈の分岐；青色と筋腹中央部；赤色）と血圧変化の典型例。血流変化の縦軸（相対血流値）は、control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した。副交感神経血管拡張線維は、三叉神経（舌神経）を求心性に電気刺激（2 msの矩形波、20 V, 20 Hz, 20秒間）することで反射的に活性化させた。電気刺激中をグレーの領域で示した。B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐（青色）、ならびに筋腹中央部（赤色）の血流変化量をまとめたグラフ。縦軸（血流変化量）は、control実験の30～50秒間における血流変化量に対する百分率で示した。例数は6。*および**は、それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す。

タンスPは求心性一次ニューロンに由来することが第一に考えられる。生体は体外・体内からの様々な刺激に常時さらされているため、求心性一次ニューロンは常になんらかの情報を伝達していると考えられる。したがって、我々が意識しない感覚も含めて、様々な情報が中枢に伝えられる際のインパルスが軸索反射 (Loaiza et al., 2002) に伴って周囲の神経終末に伝導され、終末から遊離されたサブスタンスPが拡張性血管トーン調節に関わっていることが示唆される。また培養細胞を用いた検討では、動脈の血管内皮細胞にもサブスタンスPが存在し、培養液の灌流による物理的な流れ刺激によってその遊離が亢進されることが報告されている (Milner et al.,

1990, 2004; Ralevic et al., 1990)。生体では血管内を常に血液が流れているため、血流に起因する流れ刺激によって内皮細胞からサブスタンスPが一定レベルで遊離され、拡張性トーン調節に関与することも示唆される。咬筋血管の拡張性トーン調節に関与するサブスタンスPの由来を明らかにするには、今後の更なる検討が必要とされる。

高濃度のspantide Iは、咬筋血管の基礎血流を、レーザースペckルイメージング血流計で検出することができないレベルまで大幅に抑制した (図2)。この結果は、spantide IによってサブスタンスPを介した拡張性血管トーン調節が消失したために、血管壁が自らの弾性や

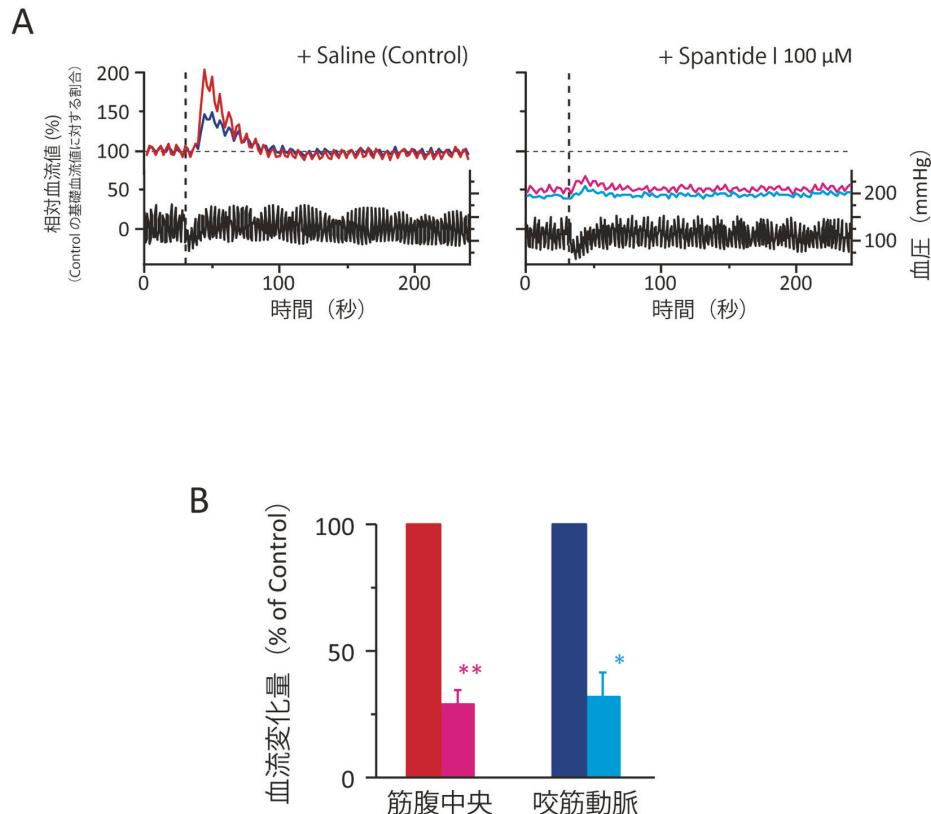


図5 Spantide Iの前処理が、咬筋のアセチルコリン誘発性血管拡張反応に及ぼす影響

A. 生理食塩水ならびにspantide I (100 μM)を投与した10分後にアセチルコリン (100 ng/kg)を静脈内投与したときの咬筋の血流変化 (咬筋動脈の分岐; 青色および水色と筋腹中央部; 赤色およびピンク色)と血圧変化の典型例。血流変化の縦軸 (相対血流値)は、control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した。アセチルコリンを投与した時点を点線で示した。B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (生理食塩水投与後; 青色, spantide I投与後; 水色), ならびに筋腹中央部 (生理食塩水投与後; 赤色, spantide I投与後; ピンク色)の血流変化量をまとめたグラフ。縦軸 (血流変化量)は、control実験の30~50秒間における血流変化量に対する百分率で示した。例数は5。*および**は、それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す。

収縮性トーン調節によって非生理的なレベルまで過度に収縮した結果、血流シグナルが検出できなくなったことを示唆する。生理的な条件下では、定常状態の基礎血流は、交感神経血管収縮線維による収縮性トーン調節と、サブスタンスPを介した拡張性トーン調節のバランスの下で維持され、もし拡張性トーン調節系が大幅に抑制されると血管壁が過度に収縮し、虚血に伴う組織病変を引き起こすことが示唆される。

我々は以前、浅部咬筋表層の血流動態をレーザースペックルイメージング血流計を用いて調査したなかで、定常状態の基礎血流量が少ない部位では基礎血流量が多い部位と比較して、副交感神経性血管拡張の際により大きな血流増加反応が認められることを報告した (Niioka et al., 2009b)。本研究においてサブスタンスP (図3)やアセチルコリン (図5)を投与した時にも、定常状態の基礎血流量が多い部位 (咬筋動脈の分岐部)に比較して基礎血流量が少ない部位 (筋腹中央部)で大きな血流増加反応が認められている。つまり基礎血流量の調節状態が、血管拡張反応に影響を与える事が示唆される。我々

は、基礎血流量は交感神経血管収縮線維による収縮性トーンとサブスタンスPを介した拡張性トーンとのバランスによって調節されていると仮定した。つまり基礎血流量が少ない部位は収縮性トーンの影響が大きく血管壁がより収縮した状態にあり、その血管が弛緩反応に応じる時には、強く収縮していた分に対応した拡張反応が起こると考えた。そこでspantide IでサブスタンスPを介した拡張性トーン調節を抑制し、血管壁を収縮させたときに、舌神経の電気刺激によって反射的に生じる副交感神経性血管拡張反応 (図4)ならびにアセチルコリンの静脈内投与によって生じる血管拡張反応 (図5)が増強されるのかを調べた。その結果spantide Iによって基礎血流を抑制させた状態では、副交感神経性血管拡張反応およびアセチルコリン誘発性血管拡張反応のいずれも有意な抑制を受けた (図4, 5)。特に基礎血流値が大きな部位 (咬筋動脈の分岐部)の血流を抑制した時には、抑制させた分に対応した、より大きな血流増加反応が認められることを期待したが、血流増加反応は基礎血流量が多い部位も少ない部位も同様に抑制された。

サブスタンスPによる血管拡張反応には、内皮細胞から産生・遊離されるNOが関与することが報告されている (Wallace, 1997; Hsu et al., 2003). またアセチルコリン誘発性の血管拡張反応もNO依存性である (Loke et al., 1994a, b). 加えて、咬筋における副交感神経性血管拡張反応は我々が明らかにした調節系であり (Ishii et al., 2005, 2009a, b; 石井, 和泉, 2010a, b), そこに関与する神経伝達物質の全容は未だ明らかになっていないが、そこにコリナージックなメカニズムが関与することを報告している (Ishii et al., 2005; Niioka et al., 2009a). NOは、平滑筋細胞のグアニルシクラーゼに直接作用し、cGMPの産生を促すことで血管拡張に重要な役割を演じており (Moncada et al., 1991; Sausbier et al., 2000), 近年の報告でも、平滑筋細胞のグアニル酸シクラーゼがNOに対して高い感受性を示すことや、NOの量に依存して血管径の増大が認められることから、血管トーン調節に対するNOの重要性が示されている (Held & Dostmann, 2012). Spantide Iは、サブスタンスP受容体を阻害し、内皮細胞からのNO産生・遊離を抑制したため血管が収縮し、定常状態の基礎血流量が減少したことが考えられる。またspantide I存在下では、副交感神経血管拡張線維を興奮させたりアセチルコリンを投与して内皮細胞のNO産生系が亢進されても、定常状態のNO量がspantide Iの作用によって減少しているため、平滑筋細胞に作用するNOが十分な量に至らず、血管拡張反応が抑制されたことが考えられる。咬筋における血管拡張反応とNOとの関連については、今後の検討でNOの定量的な解析などを行い明らかにしていく予定である。

結 論

咬筋における定常状態の基礎血流は、サブスタンスP受容体の選択的阻害薬によって有意に抑制された。また基礎血流が低下した状態では、副交感神経性血管拡張反応ならびにアセチルコリンの投与によって誘発される血管拡張反応が抑制された。これらの結果から、咬筋血管では、サブスタンスPがその受容体を介して拡張性トーン調節に関与していることが示唆された。またサブスタンスPによる拡張性トーンの維持が抑制されると血管が過度に収縮し、その後の血管拡張反応に対して抑制的に影響することが示唆された。

謝 辞

本研究は、平成22年度北海道医療大学歯学会奨励研究金(研究テーマ名;ラット咬筋の拡張性基礎血流調節に関わるサブスタンスPの役割の解明)の助成を受けて実

施した。

論 文

- Anderson LC, Martin DJ, Phillips DL, Killpack KJ, Bone SE & Rahimian R. The influence of gender on parasympathetic vasodilatation in the submandibular gland of the rat. *Exp Physiol* 91: 435-444, 2006.
- Barcroft H, Bonnar WM, Edholm OG & Effron AS. On sympathetic vasoconstrictor tone in human skeletal muscle. *J Physiol* 102: 21-31, 1943.
- Berggreen E & Heyeraas KJ. The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret. *J Dent Res* 78: 1535-1543, 1999.
- Berggreen E & Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP (8-37) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. *Arch Oral Biol* 45: 537-542, 2000.
- Bevan JA & Brayden JE. Nonadrenergic neural vasodilator mechanisms. *Circ Res* 60: 309-326, 1987.
- Bulbring E & Burn JH. The sympathetic dilator fibres in the muscles of the cat and dog. *J Physiol* 83: 483-501, 1935.
- Champlin R, Jansen J, Ho W, Gajewski J, Nimer S, Lee K, et al. Retention of graft-versus-leukemia using selective depletion of CD8-positive T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease following bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Transplant Proc* 23: 1695-1696, 1991.
- Delius W, Hagbarth KE, Hongell A & Wallin BG. General characteristics of sympathetic activity in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand* 84: 65-81, 1972.
- Guyton AC & Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, Hall JE, editors. *Muscle Blood Flow and Cardiac Output During Exercise; the Coronary Circulation and Ischemic Heart Disease*: Elsevier Saunders, 2006, p246-257.
- Hagbarth KE & Vallbo AB. Pulse and respiratory grouping of sympathetic impulses in human muscle-nerves. *Acta Physiol Scand* 74: 96-108, 1968.
- Held KF & Dostmann WR. Sub-Nanomolar Sensitivity of Nitric Oxide Mediated Regulation of cGMP and Vasomotor Reactivity in Vascular Smooth Muscle. *Front Pharmacol* 3: 130, 2012.
- Hsu YY, Jou YT, Wong R, Karabucak B, Simchon S & Kim S. Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-

- NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *Int Endod J* 36: 840-847, 2003.
- Ishii H & Izumi H. GABA_B receptors in the NTS mediate the inhibitory effect of trigeminal nociceptive inputs on parasympathetic reflex vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R776-R784, 2012.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Circulating adrenaline released by sympathoadrenal activation elicits acute vasodilatation in the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 486-494, 2009a.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Difference between male and female rats in cholinergic activity of parasympathetic vasodilatation in the masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 533-542, 2009b.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Vagal visceral inputs to the nucleus of the solitary tract: involvement in a parasympathetic reflex vasodilator pathway in the rat masseter muscle. *Brain Res* 1312: 41-53, 2010.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in the masseter muscle compensates for carotid hypoperfusion during the vagus-mediated depressor response. *Brain Res* 1370: 145-153, 2011.
- Ishii H, Niioka T, Sudo E & Izumi H. Evidence for parasympathetic vasodilator fibres in the rat masseter muscle. *J Physiol* 569: 617-629, 2005.
- Ishii H, Niioka T, Watanabe H & Izumi H. Inhibitory effects of excess sympathetic activity on parasympathetic vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R729-R736, 2007.
- Izumi H & Karita K. Selective excitation of parasympathetic nerve fibers to elicit the vasodilatation in cat lip. *J Auton Nerv Syst* 37: 99-107, 1992.
- Izumi H & Karita K. Innervation of the cat lip by two groups of parasympathetic vasodilator fibres. *J Physiol* 465: 501-512, 1993.
- Jow RW & Clark GT. Endurance and recovery from a sustained isometric contraction in human jaw-elevating muscles. *Arch Oral Biol* 34: 857-862, 1989.
- Joyner MJ & Dietz NM. Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand* 177: 329-336, 2003.
- Karita K & Izumi H. Effect of baseline vascular tone on vasomotor responses in cat lip. *J Physiol* 482: 679-685, 1995.
- Laverty R. Relation in rat hind-limb blood vessels between nervous vasomotor tone and the response to vasoconstrictor drugs. *Br J Pharmacol Chemother* 18: 451-464, 1962.
- Loaiza LA, Yamaguchi S, Ito M & Ohshima N. Vasodilatation of muscle microvessels induced by somatic afferent stimulation is mediated by calcitonin gene-related peptide release in the rat. *Neurosci Lett* 333: 136-140, 2002.
- Loke KE, Sobey CG, Dusting GJ & Woodman OL. Cholinergic neurogenic vasodilatation is mediated by nitric oxide in the dog hindlimb. *Cardiovasc Res* 28: 542-547, 1994a.
- Loke KE, Sobey CG, Dusting GJ & Woodman OL. Requirement for endothelium-derived nitric oxide in vasodilation produced by stimulation of cholinergic nerves in rat hindquarters. *Br J Pharmacol* 112: 630-634, 1994b.
- Milner P, Bodin P, Guiducci S, Del Rosso A, Kahaleh MB, Matucci-Cerinic M, et al. Regulation of substance P mRNA expression in human dermal microvascular endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol* 22: S24-27, 2004.
- Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J & Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci* 241: 245-248, 1990.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in the parasympathetic vasodilatation of the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 909-916, 2009a.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Regional differences in blood flow variation in rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 1022-1028, 2009b.
- Ralevic V, Milner P, Hudlicka O, Kristek F & Burnstock G. Substance P is released from the endothelium of normal and capsaicin-treated rat hind-limb vasculature, in vivo, by increased flow. *Circ Res* 66: 1178-1183, 1990.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 87: 825-830, 2000.
- van Steenberghe D, De Vries JH & Hollander AP. Resistance of jaw-closing muscles to fatigue during repetitive maximal voluntary clenching efforts in man. *Arch Oral Biol* 23: 697-701, 1978.
- Wallace WF. Contribution of nitric oxide to vasodilatation

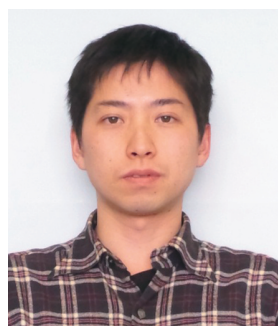
by substance P in human forearm vessels. Clin Sci (Lond) 93: 607-609, 1997.

Zochodne DW & Ho LT. Influence of perivascular peptides on endoneurial blood flow and microvascular resistance in the sciatic nerve of the rat. J Physiol 444: 615-630, 1991.

Zochodne DW & Ho LT. Vasa nervorum constriction from substance P and calcitonin gene-related peptide antagonists: sensitivity to phentolamine and nimodipine. Regul Pept 47: 285-290, 1993.

石井久淑, 和泉博之. 咀嚼筋の自律神経系を介する血管拡張反応 - 骨格筋における新たな血流増加機構 -. 北海道医療大学歯学雑誌 29: 1-23, 2010a.

石井久淑, 和泉博之. 咀嚼筋の自律神経性血流調節に関する末梢性及び中枢性神経機構. 自律神経 47: 340-349, 2010b.



新岡 丈治

北海道医療大学 薬学部/大学教育開発センター (生物・運動科学分野)

略歴

平成12年3月 昭和大学 薬学部 卒業
 平成12年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士前期課程入学
 平成14年3月 同 修了
 平成14年3月 学位取得 (薬学修士 昭和大学第566号)
 平成14年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程入学
 平成16年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生理学講座 助手
 平成17年3月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程修了
 平成17年3月 学位取得 (薬学博士 昭和大学第1898号)
 平成19年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 生理学分野 助教 (名称変更)
 平成23年4月 北海道医療大学 薬学部 人間基礎科学講座 (生物学) 講師
 平成24年4月 北海道医療大学 薬学部/大学教育開発センター (生物・運動科学分野) 講師 (名称変更)

現在に至る