

明 細 書

発明の名称 : 生体内アセチルコリン産生促進装置

技術分野

[0001] 本発明は、生体内でのアセチルコリンの産生を促進する装置に関する。

背景技術

[0002] アセチルコリンは、コリンの酢酸エステルであり、副交感神経や運動神経の末端から刺激に応じて遊離され、シナプス部および終板で興奮伝達物質(神経伝達物質)となる物質である。アセチルコリンは、血圧降下、心臓抑制(心拍数の低下)、腸管収縮、骨格筋収縮などの生理作用を示す。また、アセチルコリン受容体に結合したアセチルコリンはアセチルコリンエステラーゼやコリンエステラーゼによってコリンと酢酸に加水分解されて筋肉は弛緩する。

[0003] 生体内でのアセチルコリン濃度を高めるコリンエステラーゼ阻害剤を、老人性痴呆、脳血管性痴呆、注意欠陥多動障害、緑内障、重症筋無力症又は偏頭痛の予防、治療又は改善に用いることが知られている(特許文献1)。また、アセチルコリンは、副交感神経を刺激してリラックス状態を作り出し、血圧を下げ、心拍数を低下させる作用があるので、降圧や不眠症の解消、さらには、交感神経系亢進時における耐糖能異常を誘発することによる血糖値の上昇を抑制することにも有用であると考えられる。

[0004] 上記の通り、生体内でのアセチルコリンの濃度を増大させるコリンエステラーゼ阻害剤はよく研究され、種々の化合物が知られている。しかしながら、生体内でのアセチルコリンの産生を促進する装置は全く知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1 : 再表03/082820

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、生体内でのアセチルコリンの産生を促進する装置を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、四肢の動脈を閉塞することにより阻血し、一定時間阻血後に動脈の閉塞を解放して再灌流することを繰り返すことにより、生体内でのアセチルコリンの産生が促進されることを見出した。従って、四肢の動脈の阻血－再灌流のサイクルを繰り返すことが可能な装置は、生体内でのアセチルコリンの産生を促進することができる。

[0008] すなわち、本発明は、四肢のいずれかの部位と接触し、加圧されるとその部位における動脈を圧迫する動脈圧迫部材と、該動脈圧迫部材に接続され、使用時に該動脈圧迫部材を加圧して前記動脈を圧迫して阻血し、かつ、加圧を解除して前記動脈に血液を再灌流する加圧手段とを具備する、生体内アセチルコリン産生促進装置を提供する。また、本発明は、動物の動脈を圧迫して阻血し、次いで前記動脈に血液を再灌流するサイクルを1回以上繰り返すことを含む、生体内アセチルコリン産生促進方法を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明の装置を動物に適用して四肢の動脈の阻血－再灌流を繰り返すことにより、アセチルコリンの産生を促進することができ、生体内でのアセチルコリンの濃度を高めることができる。従って、本発明の装置を適用することにより、これまでに知られているコリンエステラーゼ阻害剤の薬効である老人性痴呆、脳血管性痴呆、注意欠陥多動障害、緑内障、重症筋無力症又は偏頭痛の予防、治療又は改善や、血圧の低下、不眠症の解消、リラックス状態の作出、耐糖能異常による血糖値上昇の抑制等を達成できる。特に、血糖値に関しては、後述のマウスを用いた動物実験により明らかとなっており、本発明の装置により、血糖値の低下、又は血糖値の上昇抑制を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A]図1A～図1Cは、下記実施例1において行った、コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)遺伝子欠損に関する実験結果を示す図である。Ch

A T 遺伝子の欠損は、 β -カテニン及び $C \times 43$ を介して細胞間コミュニケーションに影響を及ぼす。(A) C h A T に特異的な m i R R N A ! 発現ベクターを一過的に感染させることにより、C h A T のノックダウンをヒト尿管上皮細胞 HEK293 細胞において確認した。G F P のシグナル (緑色) を示す破線によって囲まれた形質転換細胞では、C h A T の免疫応答性 (赤色) が弱まったことが示された。

[図1B] (B) この HEK293 細胞を用いて安定的に形質転換した C h A T K O (ノックダウン) 細胞では、対照の L a c Z K O 細胞と比較して、細胞間で観察される β -カテニンの免疫応答性がより少なく、細胞は撹拌により容易に分散した。C h A T K O 細胞では、細胞膜で見られる A C h の免疫活性シグナルがより少なかった。

[図1C] (C) 免疫細胞化学及びウエスタンブロット解析から、C h A T に特異的な m i R R N A ! 発現ベクターで安定に形質転換したマウス心筋由来の H L - 1 細胞である C h A T K O H L - 1 細胞では、対照の L a c Z K O H L - 1 細胞と比較して、 $C \times 43$ の発現がより少ないことが分かった。L Y 色素を用いてその細胞間物質輸送を評価する方法においては、L Y 色素移動は、対照細胞と比較して、直線上に並べた C h A T K O H L - 1 細胞で抑制された。

[図2A] 図2A～図2Eは、下記実施例1において行った、C h A T の抑制に関する実験結果を示す図である。細胞の C h A T を抑制すると、より多くの酸素及び A T P の消費を伴うエネルギー代謝が亢進する。(A) A C h レベルが低い (対照を基準として、 $9.3 \pm 3.5\%$) C h A T K O H E K 細胞では M T T 活性が上昇し (対照を基準として、 $384.8 \pm 20.8\%$ 、 $P < 0.01$)、これと並行してより多くの酸素が消費された (対照を基準として、 $-239.4 \pm 26.4\%$ 、 $P < 0.01$)。

[図2B] (B) C h A T K O 細胞に含まれる A T P は、対照よりも少なかった (対照対 C h A T K O : 765.1 ± 56.9 対 425.7 ± 18.7 m M / タンパク質 1 g 、 $P < 0.01$)。

[図2C] (C) 2 mMの CoCl_2 により化学的に誘導した低酸素条件では、対照よりも多いChAT KO HEK細胞が死んだ（対照対ChAT KO : 100.0 ± 0.35 対 26.6 ± 2.33 、 $P < 0.01$ ）。

[図2D] (D) 同様にChAT KO HL-1細胞も対照よりも多いATPを消費した（対照対ChAT KO : 271.9 ± 28.2 対 83.1 ± 8.8 mM/タンパク質1 g、 $P < 0.01$ ）。

[図2E] (E) ChAT阻害薬であるBrACh ($10 \mu\text{M}$) 及びヘミコリニウム-3 ($10 \mu\text{M}$) もまた、ChAT KO HEK細胞で見られたのと同様に、ラット心筋由来H9c2細胞でのMTT活性を上昇させた。ヘミコリニウム-3はさらに、H9c2細胞でのATP含量を低下させた。

[図3] 下記実施例1において行った、ChATノックダウン (KO) HL-1細胞に関する実験結果を示す図である。ChATノックダウン (KO) HL-1細胞は、ノルエピネフリン (NE) 誘導性細胞死により感受性が高かった。対照細胞との比較により評価した、ChAT KO細胞の生存率は、2 mMのNEで処理した対照細胞がほぼ100%であったのとは対照的に、NEにより用量依存的に低下した。2 mMのNEを用いた場合、ChAT KO細胞はより多くの活性酸素種を産生し、APFによる赤色の蛍光を、対照よりも多く示した。これと一致して、ChAT KO細胞では、基準条件 (0時間) での活性型カスパーゼ-3の発現が高く、NEを使用すると、カスパーゼ-3の活性化はChAT KO細胞でさらに高まった。

[図4] 下記実施例1において行った、マウスの後肢の阻血-再灌流に関する実験結果を示す図である。後肢阻血-再灌流はChATとCHT1の発現を、手技を加えた後肢だけでなく心臓でも増強する。左の後肢に阻血-再灌流を行ったことで、右の後肢 (R) と比較して、16時間以内のChAT及びCHT1のタンパク質発現が上昇した。これらの骨格筋での蛋白発現上昇に付随して、心臓でもまたChAT及びCHT1の両方の発現が、それぞれ同様な経時変化で増加した。

[図5] 下記実施例1において行った、阻血-再灌流 (IR) 処置とChAT活

性の関係に関する実験結果を示す図である。 阻血－再灌流（IR）処置は、ChAT活性を介して、心臓全体の虚血再灌流負荷における心筋梗塞から心臓をより多く保護する。IRを行わなかった対照と比較して（ 0.61 ± 0.03 ）、IR処置は、より心臓を保護し、そしてTTC染色で示される梗塞部を減少させた（ 0.26 ± 0.03 、 $P < 0.01$ ）。ヘミコリニウム－3を用いた前処理により、IRによる心保護効果は完全に失われた（IRを基準として、 0.56 ± 0.03 、 $P < 0.05$ ）。

[図6A]図6A～図6Dは、下記実施例1において行った、後肢阻血－再灌流と心臓ATPレベルとの関係に関する実験結果を示す図である。 後肢阻血－再灌流が心保護に及ぼす遠隔効果は、心臓ATPレベルを維持する、心臓での非神経性コリン作動系の活性化に寄与する。（A）心臓でのATPレベルは、IRにより、16時間の間に徐々に増加した（IRを基準として、 $256.4 \pm 13.1\%$ 、4h、 $P < 0.01$ ）。

[図6B]（B）IRによって引き起こされる心臓ATPレベルの増加（IR： 11.5 ± 0.9 mM／タンパク質1g 対対照： 5.9 ± 0.5 mM／タンパク質1g、 $P < 0.01$ ）は、ヘミコリニウム（HC）－3を用いた前処理により抑制された（HC－3： 6.4 ± 1.0 mM／タンパク質1g、IRを基準として、 $P < 0.05$ ）。

[図6C]（C）これらの条件では、心臓AChレベルもまたこれらの傾向に続き、ATPレベルと並行して、AChレベルもIRによって増加し（IR： 2.78 ± 0.17 nmol／タンパク質1g 対対照： 2.32 ± 0.12 nmol／タンパク質1g、 $P < 0.05$ ）、そしてHC－3によって弱まった（HC－3： 2.14 ± 0.07 、IRを基準として、 $P < 0.05$ ）。

[図6D]（D）eNOS KOマウスでは、心臓でのACh合成はIRによってはアップレギュレートされなかった（NS：有意差なし）。

[図7]本発明の装置の一具体例の構成を模式的に示す図である。

[図8]図7に示す装置においてプログラムした、加圧－解除のサイクルを示す

図である。

[図9]図7に示す装置を複数の被検者に適用して阻血－再灌流サイクルを3回繰り返した場合の心拍数の経時変化を示す図である。対照として、阻血－再灌流サイクルを行わなかった被検者の心拍数の経時変化も併せて示す。

[図10]図7に示す装置を複数の被検者に適用して阻血－再灌流サイクルを1回繰り返した場合の心拍数の経時変化を示す図である。対照として、阻血－再灌流サイクルを行わなかった被検者の心拍数の経時変化も併せて示す。

[図11]下記実施例3の結果、すなわち、マウスに高脂肪食を与え、後脚に対するIR（3分虚血2分再灌流3回繰り返し）を毎日、11日間行い、IR未処理のマウスとBS(血糖値)を比較した結果を示す図である。

[図12]下記実施例4の結果、すなわち、マウスに高脂肪食を与え、IR（3分虚血2分再灌流3回繰り返し）を隔日(0日目、2日目、4日目)で行い、IR未処理のマウスとBS(血糖値)を比較した結果を示す図である。

[図13]下記実施例5の結果、すなわち、マウスに高脂肪食を与え、IR(2分虚血2分再灌流3回繰り返し)を実施例4とは異なり、毎日11日間行った時のBS（血糖値）を比較した結果の図である。

[図14]下記実施例6の結果、すなわち、マウスに高脂肪食を7－11日間摂取させながら、IR（2分虚血2分再灌流3回繰り返し）を毎日行い、体重変化を比較した結果の図である。

発明を実施するための形態

[0011] 下記実施例1において、動物実験に基づき具体的に記載するとおり、本願発明者らは、四肢の動脈を閉塞することにより阻血し、一定時間阻血後に動脈の閉塞を解放して再灌流することを繰り返すことにより、生体内でのアセチルコリンの産生が促進されることを見出した（ただし、ヒト被験者においては、直接的に心臓内AChの測定が不可能であることから、心拍数減少効果をもって、心臓への副交感神経系の亢進すなわち神経終末からのACh分泌亢進およびそれによる心筋内ACh産生増加とみなした）。本発明は、この新知見を基礎とする。すなわち、本発明の装置は、四肢の動脈の阻血と再灌流を行うも

のである。

- [0012] 本発明の生体内アセチルコリン産生促進装置は、四肢のいずれかの部位と接触し、加圧されるとその部位における動脈を圧迫する動脈圧迫部材を具備する。ここで、「四肢のいずれかの部位」は、腕でも脚でもよく、腕の場合、上腕部でも肘部でもよく、脚の場合、大腿部でも膝部でもよい。
- [0013] 動脈圧迫部材としては、カフを好ましく用いることができる。カフは、四肢に巻き付ける帯状の袋で、空気を送り込むことによって膨張し、その結果、四肢が締め付けられて動脈が圧迫されるものである。カフは、血圧測定において常用されている周知のものであり、本発明においても周知のカフを用いることができる。カフ自体は周知であり、市販されているので、市販品を用いることも可能である。
- [0014] 動脈圧迫部材はカフに限定されるものではなく、動脈を圧迫して阻血可能なものであればどのような構成のものでもよい。例えば、帯状又は紐状の部材を四肢に巻き付け、空気を送ることなく直接モーターで締め付けるようにしたもの、剛性のある2つの部材でリング状部材を構成し、これらの部材をモーターでスライドさせてリング状部材の直径を小さくすることにより、リング状部材の中に挿入された四肢を締め付けるもの等でもよい。
- [0015] 本発明の装置はさらに、動脈圧迫部材に接続され、使用時に該動脈圧迫部材を加圧して前記動脈を圧迫して阻血し、かつ、加圧を解除して前記動脈に血液を再灌流する加圧手段とを具備する。加圧手段は、手動により駆動と停止を行うものでもよいが、自動的に駆動と停止を行うようにしておけば、使用者は、装置の使用中に他の作業をしたり、テレビを見たり、さらには寝ることもできるので便利で好ましい。自動的に駆動と停止を行う場合、加圧手段は、1～15分間の加圧と、該加圧後の解除から成るサイクルを1回以上、好ましくは2回～10回、さらに好ましくは2回～5回繰り返すようにプログラムされていることが好ましい。
- [0016] 動脈圧迫部材がカフの場合には、好ましい例として、ポンプと、該ポンプと前記カフを連結し、該ポンプから前記カフに空気を送る送気管と、該送気

管に設けられたバルブとを具備し、該ポンプを作動させて前記カフを加圧し、前記バルブを開いて加圧を解除するように構成されているものが挙げられる。この場合、前記バルブが電動バルブであり、該電動バルブの電源と、前記ポンプの電源がプログラムリレーを介して該電動バルブ及び該ポンプにそれぞれ接続され、該プログラムリレーにおいて、該ポンプの駆動による加圧と、前記電動バルブの解放による加圧後の解除から成るサイクルを1回以上繰り返すようにプログラムされているものが好ましい。さらに、前記送気管及び前記プログラムリレーに接続された圧力スイッチをさらに具備し、該圧力スイッチは、前記送気管内の圧力を検知し、検知した圧力が設定圧力未満か否かの信号を前記プログラムリレーに送り、設定圧力未満では前記ポンプの電源から前記ポンプに電力が供給されて該ポンプが駆動して前記カフを加圧し、設定圧力以上では、前記ポンプの電源から前記ポンプに電力が供給されずポンプが駆動しないように構成されているものが好ましい。この装置の場合、阻血－再灌流のサイクルが、1～15分間の加圧と、1分間～3時間の加圧解除とから成り、該サイクルを2回～10回繰り返すようにプログラムリレーにおいてプログラムされていることが好ましく、特に、加圧時間が1分間～15分間であり、加圧解除時間が1分間～15分間であり、前記サイクルを2回～5回繰り返すようにプログラムされているものが好ましい。なお、設定圧力は、四肢の組織をできるだけ損傷しないようにするために、阻血を達成できる（すなわち、動脈内を血液が流れないようにする）のに必要な圧力であって、できるだけ低い圧力が好ましく、従って、使用者の最大血圧よりも5～10mmHg程度高い圧力が好ましい。

[0017] 以下、図面に基づき、本発明の装置の好ましい具体例を説明する。

[0018] 図7に、本発明の装置の一具体例の構成を模式的に示す。以下、この具体例について説明する。なお、具体例には、電源の電圧等、種々の数値が含まれるが、これらの数値は好ましい数値を例示的に示すものであり、支障が生じない限り他の数値を採用することも可能である。

[0019] 図7中、1は、家庭用の交流電源(AC100V)に接続された電源スイッチ、2

は、交流100V(AC100V)を直流24V(DC24V)に変換し、DC24Vを供給する直流電源、3は、AC100VをDC6Vに変換し、DC6Vを供給する直流電源、4は圧力スイッチ、5はプログラムリレー、6はポンプ、7は電動バルブ、8はポンプ6からカフ9に空気を送る送気管、9はカフである。これらの各部品は周知のものであり、市販品を利用可能である。また、阻血－再灌流サイクルの各時間や、繰り返し回数も適宜変更することができる。

[0020] 電源スイッチ1を閉じると電源2及び電源3にAC100Vが供給され、電源2はDC24Vを、電源3はDC6Vを出力可能となる。電源2は、圧力スイッチ4及びプログラムリレー5に直接繋がっている（開閉スイッチを介さない）ので、電源スイッチ1閉で圧力スイッチ4とプログラムリレー5にはDC24Vが供給され起動状態となる。一方、電源3は、ポンプ6及びバルブ7にプログラムリレー5を介して繋がっているので、電源スイッチ1閉でもプログラムリレー5内のリレースイッチが閉じないとポンプ6やバルブ7にはDC6Vは供給されない。圧力スイッチ4、ポンプ6、バルブ7、カフ9は、送気管8を介して繋がっている。ポンプ6は、DC6Vが供給されると、ポンプ外の空気を吸い込んで管8内に空気を送り込みカフ9を加圧する。バルブ7は、0Vで開きDC6Vで閉じるので、0V時には管8及びカフ9内部は大気圧と同等となり、DC6V時には大気に対して閉じられる。圧力スイッチ4は、管8を介してカフ9内の圧力を検知し、大気圧差で+50～250mmHgの任意の設定圧力未満と設定圧力以上でそれぞれ別の信号をプログラムリレーに送っている。プログラムリレー5は、圧力スイッチ4からの設定圧力未満の信号ではポンプ6及びバルブ7にDC6Vを供給し管8及びカフ9内を加圧する。設定圧力以上の信号でポンプ6へのDC6Vのみ供給を停止（バルブ7へはDC6V供給は続ける）する。このため、カフ9内圧は、圧力スイッチ4において設定した任意の圧力に保たれる。

[0021] プログラムリレー5は、ポンプ6及びバルブ7へのDC6Vの供給を同時に停止し、管8及びカフ9内圧を大気圧と同等にすることもできる。また、これらの動作、すなわち、カフ9の内圧を圧力スイッチ4で設定された圧力に保つ動作と大気圧と同等にする動作を任意の時間、任意のパターンで繰り返すことがで

きる。

[0022] この具体例の装置のプログラムリレー5には、図8に示した制御プログラムが書き込まれている。阻血時には、カフ9内圧が圧力スイッチ4で設定された圧力となり、被検者の上腕部や大腿部を締付け阻血する。解除時には、カフ9内圧は大気圧とほぼ同等となり灌流する。

[0023] 使用時に、電源スイッチ1閉で、1～15分の任意の時間阻血後、1～15分の任意の時間灌流し、これを任意の0～5回繰り返した後、0～3時間の任意の時間灌流し、この動作を0～5回の任意の回数繰り返すようにプログラムされている。

実施例

[0024] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0025] 先ず、阻血－再灌流サイクルを繰り返すことにより生体内でのアセチルコリン(Ach)産生が促進されることを証明する動物実験を実施例1として記載する。

[0026] 実施例1

方法

1. C h A T 遺伝子のノックダウン

BLOCK-iT (商標) Pol II miR RNAi発現ベクターであるpcDNA (商標) 6.2-GW/ EmGFP-miR (Invitrogen Corporation、カールスバッド、カリフォルニア、米国) を用いて、C h A T 遺伝子のノックダウンを行った。製造業者によるプロトコールに従って、商業上望ましく、かつ、予め設計されているヒト又はマウスC h A T に特異的なR N A i 配列を用いて二本鎖オリゴを調製し、これを発現ベクター中にサブクローニングした。ネガティブコントロールとしては、これもまた商業上望ましいとされている、L a c Z に特異的なR N A i 配列をサブクローニングし、ネガティブコントロール発現ベクターを構築した。標的遺伝子であるC h A T の発現が抑制されたかを確認するために、Effectene transfection reagent (Q I A G E N) を用いて一過的に形質

転換したH E K 2 9 3細胞を、免疫細胞化学的な実験により試験した。H E K 2 9 3細胞、C h A T K O H E K細胞、並びにマウス心房心筋由来のH L - 1細胞、C h A T K O H L - 1細胞に適した選択的抗生物質を用い、C h A Tノックダウン発現ベクターの安定な形質転換体を作出した。形質転換された細胞は、G F Pの発現により容易に検出された。

[0027] 2. 免疫細胞化学的試験

一次抗体として200倍に希釈したヤギ抗C h A Tポリクローナル抗体 (MILLIPORE、ビルリカ、マサチューセッツ、米国)、200倍に希釈したウサギ抗-カテニンポリクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY, Inc.、ダンヴァーズ、マサチューセッツ、米国)、500倍に希釈したラット抗A C hポリクローナル抗体 (MILLIPORE)、及びウサギ抗C x 4 3ポリクローナル抗体 (ZYMED Laboratories Inc.、サウスサンフランシスコ、カリフォルニア、米国)を用い、免疫細胞化学的解析を行った。4℃で一晩インキュベートした後、P B Sで洗浄し、それぞれに適した二次抗体に結合した免疫蛍光で処理し、その後レーザー共焦点顕微鏡 (OLYMPUS、東京、日本)で観察した。

[0028] 3. ウェスタンブロット解析

本願発明者らによる研究で既に報告しているように、ウェスタンブロット解析を行った [2、3、7、10、11]。この試験では一次抗体として、500倍に希釈したヤギ抗C h A Tポリクローナル抗体 (MILLIPORE)、500倍に希釈したウサギ抗C H T 1ポリクローナル抗体 (Antagene, Inc.、リモネスト、フランス)、500倍に希釈したウサギ抗切断型カスパーゼ-3モノクローナル抗体 (Cell Signaling TECHNOLOGY, Inc.)を使用した。適したH R P結合二次抗体と反応させた後、1 T B S Tで洗浄し、Luminata (商標) Forte Western HRP基質 (MILLIPORE)を用いてシグナルを検出した。

[0029] 4. L Y色素移動アッセイ

心筋細胞由来の細胞に及ぼす非神経性コリン作動系の効果を評価するために、恒久的にC h A TがノックダウンされているH L - 1細胞である、C h A T K O H L - 1細胞を得た。これらの細胞を、細胞が60μmの幅で直

線状に並ぶように処理した、ガラス底のシャーレに播種した (Cyto Graph, Dai Nippon Printing Co., Ltd., 東京、日本)。直線状に並べた細胞は、それぞれが $200\text{ }\mu\text{m}$ 離れ、並行したパターンのバンドを形成した。培地を除去した後、直線状に並んだ細胞を 27 ゲージの針で垂直に掻き取り、1%のルシファーイエロー色素を掻き取った領域の中央に乗せた。1 分後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、その後、掻き取った領域から色素が移動した距離を免疫蛍光顕微鏡で評価した。

[0030] 5. 細胞培養

HEK 293 細胞と、ラット胚由来で自然に不死化した心筋芽細胞である H9c2 細胞を、10% FBS と抗生物質を添加した DMEM (日本、大阪、日本) 中で培養した。具体的には、HEK 293 細胞を I 型コラーゲン (Cellmatrix, Nitta Gelatin Inc., 大阪、日本) でコーティングした培養シャーレ上で培養した。心房筋細胞由来の HL-1 細胞を、10% の FBS、4 mM の L-グルタミン、0.1 mM のノルエピネフリン及び 3 M の L-アスコルビン酸を添加した Claycomb 培地 (SAFC Biosciences, Inc., レネクス、カンザス、米国) を用い、0.02% のゼラチンと 25 g/mL のフィブロネクチンでコーティングした培養シャーレ上で培養した。

[0031] 6. 細胞内 ACh 濃度の測定

本願発明者らの最近の研究で既に報告しているように、HPLC を用いて細胞内の又は心臓 ACh 濃度を決定した [11]。細胞溶解物を調製するために、10 cm の培養シャーレから掻き取った細胞を PBS で洗浄し、0.1 mM フィソスチグミンと $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ の IPHC を内部対照として含む、1 mL の PBS に懸濁した。その後、これらの試料を 3 回凍結融解した。マウスから摘出した心臓を十分に細かくし、0.1 M 過塩素酸、0.1 mM フィソスチグミン及び $2 \times 10^{-8}\text{ M}$ の IPHC を含む 1 mL の均一化溶液存在下でホモジナイズした。0°C、 $2 \times 10^4\text{ G}$ で 15 分間遠心分離した後、1 M の重炭酸カリウムで pH を調製し、Ultrafree MC カラム (MILLIPORE) でろ過し、そして溶出液を ACh 濃度の定量に用いた。

[0032] 7. MTT 活性の測定

Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES、熊本、日本) を用い、製造業者によるプロトコールに従って MTT 活性を測定した。この活性が細胞の生死、すなわち完全な細胞の数に依存することが既に知られているが、この活性が細胞数だけでなく、細胞代謝によっても決定されることが報告された [10、12]。特に、ミトコンドリアの機能が正常でない細胞の MTT 活性は、同等の細胞数であっても活性が低下する傾向を示した。

[0033] 8. 細胞での酸素消費の測定

我々のこれまでの研究と同様に [11]、Fibox 3 (PreSense Precision Sensing、レーゲンスブルク、ドイツ) を用いて、培地中の酸素含量を決定した。特定の酸素感受性の感知装置を培養シャーレの底部に接着し、その培養シャーレ中で細胞をインキュベートした。酸素含量を連続して測定し、記録し、そして 0 時間での含量と比較した。

[0034] 9. 細胞での ATP 含量の測定

XL-ATP キット (APRO Life Science Institute、徳島、日本) を用い、プロトコールに従って、細胞及び心臓の ATP レベルを決定した。溶解物からの ATP レベルはタンパク質濃度を基に修正した。

[0035] 10. 細胞での活性酸素種産生の評価

活性酸素種の指示物質であるアミノフェニルフルオレセイン (APF、SEKISUI MEDICAL CO., LTD.、東京、日本) を用い、それぞれの濃度 (0.5、1.0、2.0 mM) のノルエピネフリン存在下での ChAT KO HL-1 細胞又は対照である HL-1 細胞による産生レベルを評価した。APF を最終濃度が 10 μ M になるように培地に加えた。細胞を APF と共に 1 時間インキュベートし、その後レーザー共焦点顕微鏡により観察した。

[0036] 11. ラングENDORF 装置を用いた、マウス心臓の全虚血モデル

ネブタールを腹腔内注入して麻酔した後、外科的ではなくて物理的な方法により、オスの C57BL/6J の左後肢に阻血 (5 分) - 再灌流 (3 分) を 3 回繰り返し行った。再灌流から 16 時間後の ChAT 及び CHT1 タ

ンパク質の発現を評価するために、右と左の大腿四頭筋を摘出した。さらに、再灌流の4時間、8時間又は16時間後に、タンパク質発現を評価するために心臓を摘出し、また別の心臓にはランゲンドルフ装置を接続し、5%二酸化炭素と95%酸素で平衡化し、ろ過したクレブスーヘンゼライト緩衝液を90 mmHgで灌流した。安定した後、ランゲンドルフで灌流した心臓を、クレブスーヘンゼライト緩衝液の灌流を30分間停止することで全虚血にし、その後60分間再灌流した。その後その心臓を1%のTTC染色液中に10分間、37℃で浸漬し、染色した心臓の中央部の横断切片を作成し、梗塞部を比較した。梗塞部の割合は、NIH画像ソフトウェアを用いて梗塞部を全体から区別することによって決定した。

[0037] 12. 統計分析

データを平均±標準誤差として表した。2群間の比較を行うためのノンパラメトリック検定を、マンローホイットニーU検定により行った。3群間でのノンパラメトリック多重比較検定を、クラスカル・ワリス検定と、それに続くフィッシャーのPLSD検定により行った。P<0.05の場合に差が有意であると見なした。

[0038] 結果

1. 非神経性コリン作動系は細胞間コミュニケーションを制御する。

非神経性コリン作動系の具体的な役割をインビトロで明らかにするために、ChAT特異的なmiRNA発現ベクターを用いてChAT遺伝子をノックダウンし、その効果を確認後HEK293細胞とマウス心房心筋由来のHL-1細胞を用いて恒久的なChAT KO細胞を調製した。一過性に形質転換したHEK293細胞でのChAT遺伝子のノックダウンを免疫細胞化学的に確認した(図1A)。形質転換された細胞は、GFPの発現(図1Aの緑色部分)によって確認された。非形質転換体(赤色)で観察されるようなChATの免疫活性は、ChAT KO細胞では完全に弱まっていた。

[0039] 恒久的なChAT KO細胞は、LacZ遺伝子ノックダウンベクター(対照細胞)で安定に形質転換した対照のHEK293細胞と比較して、成長

が遅れることなく増殖した。しかしながら、C h A T K O細胞を再度播種し、その後攪拌によって細胞を分離させると、細胞の特徴、すなわち、効率的な細胞間コミュニケーションが対照細胞と比較して損なわれたことが明らかになった（図1 B）。攪拌後、C h A T K O細胞は単一細胞として容易に分散するが、対照細胞は細胞間相互作用を維持して凝集体を形成する。対照細胞では、A C h ー陽性シグナルは細胞膜上で検出されたが、C h A T K O細胞ではこのシグナルは弱くなっていた。同様に、免疫反応性 β -カテニンのシグナルが対照細胞間では非常に強いこととは対照的に、C h A T K O細胞間では、より減弱したシグナルが検出された。

[0040] L a c Z遺伝子をノックダウンさせた対照細胞（対照細胞）と同様に、C h A T K O H L - 1細胞もまた調製した。C h A T K O H L - 1細胞では、ウェスタンブロット及び免疫細胞化学的解析で確認したように（図1 C）、C x 4 3タンパク質の発現が抑制された。対照細胞間でははっきりと検出できるC x 4 3陽性のシグナルは、C h A T K O H L - 1細胞では顕著に弱まっており、このことは細胞間コミュニケーションが妨げられたことを示唆している。色素移動アッセイでもまた、L Y色素がC h A T K O H L - 1細胞間を効率的に移動しなかったことが明らかになった。対照的に、対照細胞に乗せた色素は顕著に長い距離を移動し、このことは、非神経性コリン作動系がギャップ結合機能を制御したことを示唆している。

[0041] 総合すると、これらのデータは、非神経性コリン作動系が細胞間コミュニケーションで機能していることを示唆している。

[0042] 2. 非神経性コリン作動系はエネルギー代謝の抑制に機能している

この系のさらなる機能を解析するために、対照細胞と比較して産生レベルが10%未満のA C h合成能をもつC h A T K O H E K細胞（対照対C h A T K O : 100 ± 8.7 対 $9.3 \pm 3.5\%$ 、 $P < 0.01$ ）の細胞のエネルギー代謝について評価した。それぞれについて同等の細胞数を使用した場合であっても、C h A T K O H E K細胞におけるM T T活性は対照の活性よりも高かった（対照を基準として、 $384.8 \pm 20.8\%$ 、 P

<0.01)。この結果と一致して、ChAT KO HEK細胞は対照よりも多い酸素を消費した(対照を基準として、 $-239.4 \pm 26.4\%$ 、 $P < 0.01$) (図2A)。その結果、ChAT KO HEK細胞のATPレベルは有意に低下した(対照対ChAT KO: 765.1 ± 56.9 対 425.7 ± 18.7 mM/タンパク質1g、 $P < 0.01$) (図2B)。これらの結果は、MTT活性並びに酸素消費及びATP含量の相互変化を示しており、これは、非神経性コリン作動系が細胞のエネルギー代謝を負に制御していること、そしてこの系が細胞のATP含量を維持していることを示唆している。従って、化学的に擬似的な低酸素を生じる塩化コバルト(2 mM)で酸素の使用を阻害した場合、塩化コバルトを投与しても対照細胞と比較して、ChAT KO HEK細胞は細胞死を起こしやすい(対照対ChAT KO: 100.0 ± 0.35 対 $26.6 \pm 2.33\%$ 、 $P < 0.01$) (図2C)。

[0043] 同様にHL-1細胞では、非神経性コリン作動系は細胞のエネルギー代謝の制御に重要な役割を果たしている。ChAT KO HL-1細胞でのATP含量は対照よりもずっと少ない(対照対ChAT KO: 271.9 ± 28.2 対 83.1 ± 8.8 mM/タンパク質1g、 $P < 0.01$) (図2D)。この結果は、ラット心筋由来のH9c2細胞でもまた同様であった。ChAT遺伝子を欠損させる代わりに、2種類のChAT阻害薬、すなわち、ブロマセチルコリン(BrACh)とヘミコリニウム-3を使用して、ChAT活性を阻害した。10 μ Mの各阻害薬を使用した場合、H9c2細胞はいかなる形態的な変化も示さなかった。各阻害剤はH9c2細胞でのMTT活性を上昇させ、また、ヘミコリニウム-3は、ChAT遺伝子を欠損させた場合と同様に、ATPレベルを相互に減少させた(対照対ChAT KO: 92.0 ± 1.0 対 61.0 ± 1.1 mM/タンパク質1g、 $P < 0.05$) (図2E)。これらのデータもまた、細胞のATPを保存するために、非神経性コリン作動系はエネルギー代謝を負に制御し、かつ、酸素消費を抑制することを示唆している。

[0044] 3. 非神経性コリン作動系は、ノルエピネフリンの毒性から細胞を保護する
C h A T K O H L - 1 細胞をノルエピネフリン (NE) で処理した (図3)。この実験では、細胞の生存能力の指標として、NE 処理した C h A T K O H L - 1 細胞と対照細胞との間の細胞の生存率を用いた。従って、100%の割合は、NE が存在する場合であっても、両方の細胞が同様に生存していることを示した。それにもかかわらず、図3ではっきりと示されたように、NE は C h A T K O H L - 1 細胞の細胞生存率を用量依存的に低下させた (対照を基準として: 0.5 mM の NE で $73.6 \pm 1.4\%$ 、 $P < 0.01$; 1.0 mM の NE で $62.0 \pm 1.0\%$ 、 $P < 0.01$)。2 mM の NE は、C h A T K O H L - 1 細胞でより多くの細胞死を引き起こし (対照を基準として: $29.4 \pm 2.4\%$ 、 $P < 0.01$)、これは対照よりも高いカスパーゼ-3 活性を伴った。加えて、C h A T K O H L - 1 細胞は NE によるこの細胞死の間に、ROS の指示物質である APF で評価される、より多くの活性酸素種を産生した。そのような ROS 産生の増加は、部分的には細胞死によるものと推測された。これらの結果は、心筋における非神経性コリン作動系は、NE の毒性から細胞を保護するのに必須であることをはっきりと示している。

[0045] これらのインビトロでのデータを総合すると、非神経性コリン作動系は、細胞間コミュニケーションの維持、細胞のエネルギー代謝の負の制御、及び細胞死からの細胞の保護に関与している。

[0046] 4. 骨格筋の非神経性コリン作動系のインビボでの促進

この系のインビボでの制御機構を解析するために、プレコンディショニングのプロトコールと同様に、阻血 (5 分) と再灌流 (3 分) を断続的に 3 回、左大腿動脈の流動性を手で弱めることによりマウスで一過的な後肢阻血-再灌流 (IR) を行った (図4)。IR から 16 時間後、試験した左の大腿四頭筋では、反対側と比較して、C h A T と C H T 1 のタンパク質発現が顕著に上昇した。このことは、IR それ自体が骨格非神経性コリン作動系を活性化させる引き金として機能することを示唆している。

[0047] 注目すべきことに、この処置の間、心臓でもまたこの系は活性化されており、このことは、I Rが心臓の非神経性コリン作動系を遠隔的に活性化させることを示唆している。C h A Tのタンパク質発現は24時間の間に徐々に増加した。C H T 1タンパク質発現の経時変化には、同様のC h A Tのパターンが続いた。これらのデータは、I Rが試験を行った器官だけでなく、離れた器官、例えば心臓の非神経性コリン作動系もまたアップレギュレートすることを示唆している。

[0048] 5. インビボでの後肢阻血再灌流は、心臓の非神経性コリン作動系を介して心臓全体を全虚血から救出する

I Rが全虚血から心臓を保護するかを確認するために、I Rの16時間後に摘出し、ランゲンドルフ装置を用いて灌漑した心臓に、全阻血ー再灌流、すなわち30分の阻血と60分の再灌流を加えた（図5）。再灌流傷害においては、I Rを受けていない対照マウスでの梗塞部の割合は 0.61 ± 0.03 であった。対照的に、I Rを加えたマウスから摘出した心臓での割合は 0.26 ± 0.03 （対照を基準として、 $P < 0.01$ ）まで有意に低下し、このことから、マウスの心臓に及ぼすI Pの遠隔的な保護効果が確認された。この現象は後期プレコンディショニングとして周知であるが、I R処理マウスをI Rの前にC h A T阻害薬であるヘミコリニウム-3で前処理すると、I Rによるこの心筋梗塞抑制効果が弱まり、かつ、割合が対照の 0.56 ± 0.03 （I Rに対する、 $P < 0.05$ ）と同等のレベルまで回復した。これらの結果は、ヘミコリニウム-3がこの効果を打ち消すことから、心臓を保護する遠隔効果が心臓でのC h A Tのアップレギュレーションにより仲介されたことを示唆している。

[0049] 6. 遠隔効果による心保護の根底をなす機序

I R後、4時間、8時間及び16時間でそれぞれ心臓を摘出し、心臓でのA T Pレベル含量を測定した。16時間の心臓においてもより高いレベルのA T P含量が含まれていることが明らかとなり（I Rを基準として、 $256 \pm 13.1\%$ 、4時間、 $P < 0.01$ ）、このことは、I Rが心臓での

ATPレベルの上昇を引き起こすことを示唆している(図6A)。心臓で

のATPレベルの上昇が、心臓の非神経性コリン作動系のアツレギュレー
ションによるものであるかどうかを調べるために、IRの前にヘミコリニウ

ム-3を投与した。図4及び6Cに示されたように、IRは心臓でのChA
Tタンパク質の発現をアツレギュレートし、心臓でのACH(IR: 2,

78±0.17nmol/タンパク質1g対照: 2.32±0.12nmol/タンパク質1g、P<0.05)とATPレベル(IR: 11.5±

0.9mM/タンパク質1g対照: 5.9±0.5mM/タンパク質1g、P<0.01)を増加させた。しかしながら、ChAT阻害薬であるヘミ

コリニウム-3は驚くことに、心臓ATPレベルの上昇を対照レベルまで弱

めた(HC-3: 6.4±1.0mM/タンパク質1g、IRを基準として、P<0.05)(図6B)。これは、心臓の非神経性コリン作動系が心臓

のATPレベルの維持に確かに関与していることを示唆している。IRに用

いたマウスでの心臓でのACHレベルの測定もまた、この課題を支持した。ヘミコリニウム-3での前処理は、心臓ACHレベルの上昇を完全に抑制した

(HC-3: 2.14±0.07、IRを基準として、P<0.05)(図6C)。

[0050] eNOS(血管内皮型一酸化窒素合成酵素)KOマウスでは、心臓におけ

るIR誘導性のACH合成のアツレギュレーションが失われた。IRの1

6時間後でも、野生型マウスでは増加するはずの心臓ACHレベルが、IR

前と同等であった。これは、IRの遠隔効果によって誘導される心臓の非神

経性コリン作動系のアツレギュレーションに、NOが部分的に関与してい

ることを示唆している。

[0051] 実施例2

図7及び図8を参照して具体的に説明した本発明の装置を作製した。この装置を用いて、ヒトにおいて右大腿部を5分阻血し3分再灌流させた。この阻血-再灌流サイクルを1回又は3回行った。この場合の心拍数の経時変化をそれぞれ図9及び図10に示す。

[0052] 図9及び図10中、「trained」は、本発明の装置により阻血－再灌流を行ったヒト、「untrained」は、阻血－再灌流を行わなかったヒト（対照）である。図9及び図10に示す通り、阻血－再灌流サイクル直後より心拍数の低下（心臓におけるAChが増加していることおよび、中枢性に副交感神経系が活性化していることを示す）が認められ、これが約16時間持続した。なお、この効果は約24時間以内であれば持続が認められるが、それ以上間隔をあけると心拍数は再び元に戻り、再度改めて阻血再灌流をすると心拍数は低下した（データ示さず）。これは、全身の副交感神経系が亢進し、さらに心臓におけるアセチルコリン合成系が亢進したことを示唆している。

[0053] 実施例3

マウスに高脂肪食を与え、後脚に対するIR（3分虚血2分再灌流3回繰り返し）を毎日、11日間行い、IR未処理のマウスとBS(血糖値)を比較した。結果を図11に示す。

[0054] 図11に示されるとおり、IR未処理マウスでは血糖値が増加したが、IR処理マウスでは血糖値低下作用が認められた。

[0055] 実施例4

マウスに高脂肪食を与え、IR（3分虚血2分再灌流3回繰り返し）を隔日(0日目、2日目、4日目)で行い、IR未処理のマウスとBS(血糖値)を比較した。結果を図12に示す。

[0056] 図12に示されるとおり、IR未処理マウスでは血糖値が増加したが、IR処理マウスでは血糖値低下作用が認められた。この血糖低下作用は、1日おきの隔日でも明らかな効果が認められた。

[0057] 実施例5

マウスに高脂肪食を与え、IR（2分虚血2分再灌流3回繰り返し）を毎日、11日間行い、IR未処理のマウスとBS(血糖値)を比較した。結果を図13に示す。

[0058] 図13に示すように、IR処理マウスでは血糖値低下作用が認められた。この血糖値低下作用は、阻血時間を、侵襲の少ない短時間である2分間にして

も 1 1 日間持続した。

[0059] 実施例 6

マウスに高脂肪食を7-11日間摂取させながらIRを毎日行った。IRは2分～3分虚血・2分再灌流を3回繰り返した。この間の体重を測定した。結果を図14に示す。

[0060] 図14に示すように、対照群(control)と比較して、pc (IR)群では、有意に体重増加が認められなかった。共に、1日摂取量に差はなかった。一方1日おき(隔日)にIRを行った場合は、体重減少効果は見られなかった。しかし、図12が示すように、血糖低下作用はまだ認められた。

[0061] 参考文献リスト

1. Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, Katare RG, Okudela K, Kobayashi M, Sato T. Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of HIF-1 α . FEBS Lett. 2005;579:2111-2118.
2. Ando M, Katare RG, Kakinuma Y, Zhang D, Yamasaki F, Muramoto K, Sato T. Efferent vagal nerve stimulation protects heart against ischemia-induced arrhythmias by preserving connexin43 protein. Circulation. 2005;112:164-170.
3. Zhang Y, Kakinuma Y, Ando M, Katare RG, Yamasaki F, Sugiura T, Sato T. Acetylcholine inhibits the hypoxia-induced reduction of connexin 43 protein in rat cardiomyocytes. J Pharmacol Sci. 2006;101:214-222.
4. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Handa T, Yamasaki F, Sato T. Vagal nerve stimulation prevents reperfusion injury through inhibition of opening of mitochondrial permeability transition pore independent of the bradycardiac effect. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;137:223-231.
5. Handa T, Katare RG, Kakinuma Y, Arikawa M, Ando M, Sasaguri S, Yamasaki F, Sato T. Anti-Alzheimer's drug, donepezil, markedly improves

long-term survival after chronic heart failure in mice. *J Card Fail.* 2009;15:805-811.

6. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protects heart against acute ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49:234-244.

7. Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, Sato T. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:680-693.

8. Arikawa M, Katare RG, Kakinuma Y, Handa T, Ando M, Yamasaki F, Sato T. Progression of ventricular dysfunction after myocardial infarction is prevented by anti-Alzheimer's disease drug, donepezil. *Circulation* 116: II_291.

9. Okazaki Y, Zheng C, Li M, Sugimachi M. Effect of the cholinesterase inhibitor donepezil on left cardiac remodeling and autonomic balance in rats with heart failure. *J Physiol Sci.* 2010;60:67-74.

10. Kakinuma Y, Katare RG, Arikawa M, Muramoto K, Yamasaki F, Sato T. A HIF-1 α -related gene involved in cell protection from hypoxia by suppression of mitochondrial function. *FEBS Lett.* 2008;582:332-340.

11. Kakinuma Y, Akiyama T, Sato T. Cholinergic and cholinergic properties of cardiomyocytes involving an amplification mechanism for vagal efferent effects in sparsely innervated ventricular myocardium. *FEBS J.* 2009;276:5111-5125.

12. Rapoport N, Marin AP, Timoshin AA. Effect of a polymeric surfactant on electron transport in HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys.* 2000;384:100-108.

13. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Nozadze K, Wessler I. Expression and function of the non-neuronal cholinergic system in endothelial cells . *Life Sci.* 2003;72:2111-2116.
14. Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci.* 2004;9:2063-2085.
15. Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H. Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:79-88.
16. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation.* 2004;109:120-124.
17. Schwartz PJ, De Ferrari GM, Sanzo A, Landolina M, Rordorf R, Raineri C, Campana C, Revera M, Ajmone-Marsan N, Tavazzi L, Odero A. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure: first experience in man. *Eur J Heart Fail* 2008;10:884-891.
18. De Ferrari GM, Schwartz PJ. Vagus nerve stimulation: from pre-clinical to clinical application: challenges and future directions. *Heart Fail Rev.* 2011;16:195-203.
19. Hoover DB, Ganote CE, Ferguson SM, Blakely RD & Parsons RL. Localization of cholinergic innervation in guinea pig heart by immunohistochemistry for high-affinity choline transporters. *Cardiovasc Res* 2004;62:112-121.
20. Kawano H, Okada R & Yano K. Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels* 2003;18:32-39.
21. Kuwabara M, Kakinuma Y, Katare RG, Ando M, Yamasaki F, Doi Y, Sat

o T. Granulocyte colony-stimulating factor activates Wnt signal to sustain gap junction function through recruitment of beta-catenin and c adherin. *FEBS Lett.* 2007;581:4821-4830.

22. Kostin S, Hein S, Bauer EP, Schaper J. Spatiotemporal development and distribution of intercellular junctions in adult rat cardiomyocytes in culture. *Circ Res* 1999;85:154-167.

23. Wu JC, Tsai RY, Chung TH. Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 2003;88: 823-835.

24. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, Ashley E, Vichare S, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Keogh B, MacAllister RJ, Yellon DM. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:575-579.

25. Ali ZA, Callaghan CJ, Lim E, Ali AA, Nouraei SA, Akthar AM, Boyle JR, Varty K, Kharbanda RK, Dutka DP, Gaunt ME. Remote ischemic preconditioning reduces myocardial and renal injury after elective abdominal aortic aneurysm repair: a randomized controlled trial. *Circulation* 2007;116 (11 Suppl):I98-105.

26. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Bottcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sorensen HT, Redington AN, Nielsen TT. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010 ;375:727-734.

27. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res* 2008;79:377-

386.

符号の説明

- [0062]
- 1 電源スイッチ
 - 2 直流電源
 - 3 直流電源
 - 4 圧力スイッチ
 - 5 プログラムリレー
 - 6 ポンプ
 - 7 電動バルブ
 - 8 送気管
 - 9 カフ

請求の範囲

- [請求項1] 四肢のいずれかの部位と接触し、加圧されるとその部位における動脈を圧迫する動脈圧迫部材と、該動脈圧迫部材に接続され、使用時に該動脈圧迫部材を加圧して前記動脈を圧迫して阻血し、かつ、加圧を解除して前記動脈に血液を再灌流する加圧手段とを具備する、生体内アセチルコリン産生促進装置。
- [請求項2] 前記加圧手段が、1～15分間の加圧と、該加圧後の解除から成るサイクルを1回以上繰り返すようにプログラムされている請求項1記載の装置。
- [請求項3] 前記加圧手段が前記サイクルを2回～10回繰り返すようにプログラムされている請求項2記載の装置。
- [請求項4] 前記動脈圧迫部材がカフである請求項1～3のいずれか1項に記載の装置。
- [請求項5] 前記加圧手段が、ポンプと、該ポンプと前記カフを連結し、該ポンプから前記カフに空気を送る送気管と、該送気管に設けられたバルブとを具備し、該ポンプを作動させて前記カフを加圧し、前記バルブを開いて加圧を解除する請求項4記載の装置。
- [請求項6] 前記バルブが電動バルブであり、該電動バルブの電源と、前記ポンプの電源がプログラムリレーを介して該電動バルブ及び該ポンプにそれぞれ接続され、該プログラムリレーにおいて、該ポンプの駆動による加圧と、前記電動バルブの解放による加圧後の解除から成るサイクルを1回以上繰り返すようにプログラムされている請求項5記載の装置。
- [請求項7] 前記送気管及び前記プログラムリレーに接続された圧力スイッチをさらに具備し、該圧力スイッチは、前記送気管内の圧力を検知し、検知した圧力が設定圧力未満か否かの信号を前記プログラムリレーに送り、設定圧力未満では前記ポンプの電源から前記ポンプに電力が供給されて該ポンプが駆動して前記カフを加圧し、設定圧力以上では、前

記ポンプの電源から前記ポンプに電力が供給されずポンプが駆動しない請求項 6 記載の装置。

[請求項8] 前記サイクルが、1～15分間の加圧と、1分間～3時間の加圧解除とから成り、該サイクルを2回～10回繰り返す請求項 7 記載の装置。

[請求項9] 加圧時間が1分間～15分間であり、加圧解除時間が1分間～15分間であり、前記サイクルを2回～5回繰り返す請求項 8 記載の装置。

[請求項10] 血糖値低下装置又は血糖値上昇抑制装置である請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の装置。

[請求項11] 動物の動脈を圧迫して阻血し、次いで前記動脈に血液を再灌流するサイクルを1回以上繰り返すことを含む、生体内アセチルコリン産生促進方法。

[請求項12] 血糖値低下方法又は血糖値上昇抑制方法である請求項 11 記載の方法。