

ラット気道副交感神経節ニューロンに及ぼすノルアドレナリンの興奮作用

柴田, 憲一
九州大学医学部学生 (2年生)

武谷, 憲二
九州大学医学部学生 (2年生)

<https://doi.org/10.15017/7234035>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 92 (11), pp.377-383, 2001-11-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



ラット気道副交感神経節ニューロンに及ぼすノルアドレナリンの興奮作用

九州大学医学部学生(2年生)
柴田 憲一・武谷 憲二

Excitatory Effect of Noradrenaline on Rat Airway Parasympathetic Ganglion Neurons

Kenichi SHIBATA, Kenji TAKETANI

Medical Student (2nd grade), Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka 812-8582

Abstract The effects of noradrenaline (NAd) on neurons acutely isolated from airway parasympathetic ganglia of rats were investigated by use of the nystatin perforated-patch recording mode. Under current-clamp conditions, an application of 10^{-6} M NAd onto the ganglion neurons evoked a depolarization which was accompanied by regenerating repetitive action potentials. NAd concentration-dependently induced inward current with decreasing membrane conductance when a ganglion neuron was held at a holding potential of -40 mV. The half-maximum effective concentration (EC_{50}) of NAd was 1.7×10^{-7} M, and the response was mimicked by an α_1 -adrenoceptor agonist cirazoline and was inhibited by WB-4101, an α_{1A} -adrenoceptor antagonist. Oxymetazoline, a partial agonist for an α_{1A} -adrenoceptor, also evoked the inward current with an EC_{50} of 3.5×10^{-8} M. The maximum current induced by oxymetazoline (10^{-6} M) was 44% of that induced by NAd. NAd also inhibited the amplitude of M-current deactivation induced by hyperpolarizing step from a V_H of -25 mV to -50 mV with an EC_{50} of 2.0×10^{-6} M. These results suggest that NAd directly depolarizes the airway parasympathetic ganglion neurons of rats associated with an inhibition of M-current through the α_{1A} -adrenoceptors.

Key words: noradrenaline, paratracheal ganglion neuron, M-current, perforated patch recording

はじめに

下気道を支配する交感神経および副交感神経系は古典的神経伝達物質、すなわちノルアドレナリン(NAd)やアセチルコリン(ACh)のみならず、複数の非アドレナリン非コリン(NANC)性神経伝達物質を放出し、気道や血管に分布する平滑筋の収縮と弛緩サイクルを制御し、気道内腔径や気管における血流の調節を行っている⁶⁾¹¹⁾¹⁴⁾。一方、気道における感覚情報は知覚神経が中枢へと伝えるが、気道の知覚神経終末で発生した活動電位は知覚神経を上行し中枢へと情報を伝えるだけでなく、その一部は末梢分岐部を介して逆行し、分岐末端からサブスタンスPなどのタキキニン類やカルシトニン遺伝子関連ペプチドを放出させる⁹⁾。この現象を軸索反射と呼ぶが、軸索反射により放出され

た物質が血管透過性亢進、気道分泌や気道血管拡張などの炎症性反応を惹起することから、気道における神経系の異常は気道炎症に密接に関わっていると考えられる⁶⁾。

下気道の副交感神経系は、気道粘膜のごく近傍に位置する傍気管神経節で節前線維の情報を節後ニューロンへと伝達するが¹⁾、この傍気管神経節ニューロンは迷走神経節前線維からのアセチルコリン入力だけでなく軸索反射による気道知覚神経分枝からの入力も受けている¹⁸⁾¹⁹⁾。一方、交感神経節後神経線維の終末部から放出されるNAdは、自身の神経細胞体である交感神経節ニューロンを過分極させることが報告されているが、副交感神経節ニューロンに対してはAkasuらがネコの膀胱副交感神経節ニューロンを用いてNAdが興奮と抑制の2つの応答を誘発することを報告してい

る³⁾⁴⁾。Reekie と Burnstock は下気道組織標本を用いて、NAd が傍気管神経節ニューロンを興奮させることを報告した²¹⁾。しかし、彼らは組織標本を用いており、NAd が傍気管神経節ニューロンに直接作用するのか、あるいは間接効果によるのかは不明である。さらに、単一ニューロンレベルでの NAd の詳細な興奮効果のメカニズムについては全く明らかにされていない。そこで、本研究ではノルアドレナリンが傍気管神経節ニューロンに直接作用するのか否かを含め、ノルアドレナリンの傍気管神経節ニューロンにおよぼす作用とそのメカニズムを単離した傍気管神経節ニューロンを用いて電気生理学的に詳細に検討した。

方 法

1. 傍気管神経節ニューロンの単離

傍気管神経節ニューロンを、石橋らの方法に従って単離した¹²⁾。すなわち、実験には生後2週齢のラットを用い、ベントパルピタル麻酔下に速やかに気管及び気管支を摘出した。続いて、実体顕微鏡下に神経節を摘出し、コラゲナーゼ 0.3%、トリプシン 0.3%を含む標準外液中 (37°C) で45分間処理した。酵素処理の後、培養皿中でパスツールピペットを用いてニューロンを単離した。単離したニューロンは20分以内に培養皿の底に付着した。このようにして得たニューロンを用いて電気生理学的実験を行った。

本研究は日本薬理学会の「Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals」に基づいて行った。

2. 電気生理学的記録

単一ニューロンからの膜電流および膜電位の測定はニスタチン穿孔パッチ記録法を用いて行った²⁾。まず外径 1.5 mm のガラス管からパッチ電極作製機を用いて先端径が約 1 μ m のパッチ電極を作製した。その後、パッチ電極内に電極内液を充填し、倒立位相差顕微鏡でニューロンを観察しながら、三次元油圧マイクロマニプレータを用いて、電極先端をニューロンに軽く接触させ、軽く吸引することによりニスタチン穿孔パッチを形成した。膜電流および膜電位はパッチアンプ (EPC-7 List Medical) により増幅した。1 kHz 以上のノイズは電気フィルター (E-3210A NF Electronic Instruments) で除去してデジタルストレージ

オシロスコープ (VC-6025 Hitachi) で観察するとともにテープレコーダー (RE-130TE, TEAC) に保存した。全ての実験は室温 (21~24°C) で行った。実験結果は平均±標準誤差で示し、有意差検定は Student t-test により行った。

3. 溶液と薬品

標準外液のイオン組成 (mM) は、NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 2, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 10, glucose 10 で, tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris-OH) を用いて pH を 7.4 に調節した。パッチピペット内液の組成 (mM) は、K-methanesulfonate 80, KCl 70, HEPES 10 で, Tris-OH を用いて pH を 7.4 に調節した。ニスタチンは 10 mg/ml の濃度でエタノールに溶解した後、最終濃度が 100 μ g/ml となるようにパッチピペット内液に加えた。薬液は Y チューブにより急速投与した¹²⁾。この方法により記録しているニューロンの細胞外液を 20 ms 以内に完全に交換した。

結 果

1. 膜電流固定下における NAd の脱分極反応

図 1 A に電流固定下で NAd により惹起された膜応答を示す。単離した傍気管神経節細胞 (以下ニューロンと省略) の静止膜電位は -59.2 ± 2.4 mV ($n=12$) であり、 3×10^{-7} M の NAd によって検討した全てのニューロンにおいて脱分極が惹起された。この脱分極は活動電位の繰り返し発火を惹起し、ニューロンを標準外液で洗浄することにより NAd の興奮性応答は徐々に回復した。より高濃度の 10^{-4} M NAd を用いても同様な活動電位の繰り返し発火が見られ、NAd の脱分極応答に脱感作はほとんど認められなかった。また、NAd の膜抵抗に及ぼす効果を観察する目的で、テトロドトキシン (TTX) 存在下で過分極パルスを与えながら 10^{-6} M NAd を投与したところ著明な膜抵抗の上昇が見られた (図 1 B)。

2. アドレナリン受容体サブタイプ

NAd によるニューロンの脱分極が、いかなる NAd の受容体サブタイプを介しているかを明らかにするために、以下の実験を膜電位固定下で行った。

保持電位 (V_H) -40 mV において NAd は濃度依存性に膜コンダクタンスの減少を伴った内向き電流を惹

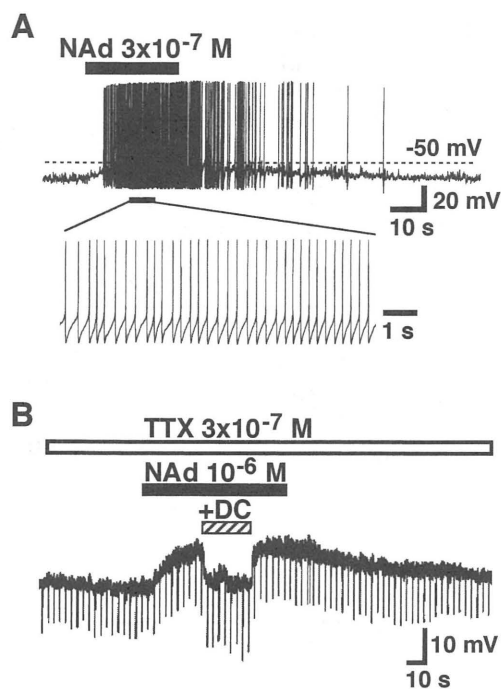


図1 ラット傍気管神経節ニューロンにおけるNAdの効果。実験は電流固定下にニスタチン穿孔パッチ記録法で行った。
A. NAdによる脱分極と、それに伴う活動電位の発火。
B. 3×10^{-7} M TTX存在下でのNAdの効果。NAd投与中、細胞内に過分極電流を与え膜電位を静止膜電位に戻し、膜抵抗の変化を調べた。下方向への線は短時間の過分極電流刺激により誘引された電圧応答である。

起した(図2 A)。図2 Bに α_1 アゴニストであるcirazolineを 3×10^{-8} , 10^{-7} , 3×10^{-7} Mの濃度で投与した時の内向き電流を示す。図2 CにはNAd, それに α_1 アゴニストであるcirazolineおよびoxymetazolineによって惹起された応答の濃度-応答曲線を示す。NAd, cirazoline, oxymetazolineの EC_{50} はそれぞれ、 1.7×10^{-7} , 6.1×10^{-8} , 3.5×10^{-8} Mであった。oxymetazolineによって惹起される電流の最大値はNAd誘発電流の最大値の約 $44.3 \pm 4.1\%$ であり、oxymetazolineはパーシャルアゴニストと考えられた。

図3 Aに示すように α_1 アドレナリン受容体アンタゴニストであるprazosinは濃度依存的にNAdで惹

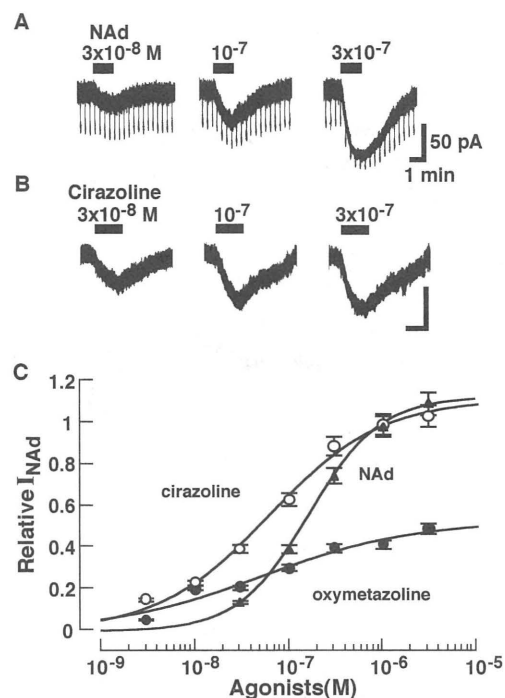


図2 NAd誘発内向き電流。実験は膜電位固定下保持電位 -40 mVで行った。
A. 種々の濃度のNAdによる内向き電流。保持電位を -40 から -55 mVまで 500 msの過分極パルスを、 15 秒ごとに与えた。
B. cirazolineによる内向き電流
C. NAd, cirazolineとoxymetazolineの濃度応答曲線。各ポイントは、 10^{-6} M NAd誘発電流に対する比率として表した。

起される電流を抑制した。同様に、 α_2 アドレナリン受容体アンタゴニストであるyohimbineも、より高濃度でNAdの反応を抑制した(図3 B)。 α_{1A} アドレナリン受容体アンタゴニストであるWB-4101もprazosinとほぼ同様にNAd応答を抑制し、prazosin, WB-4101とyohimbineの IC_{50} はそれぞれ 2.2×10^{-8} M, 2.1×10^{-8} Mおよび 2.3×10^{-6} Mであった(図3 C)。

3. 電流-電圧曲線

NAdによって誘発される内向き電流をramp-clamp法を用いて、さらに解析した。ニューロンにNAdを投与する前と投与時に、保持電位を -40 から -100 mVまで 3 秒以内に变化させるramp-clamp法によって得られた電流を図4 Aに示す。NAd投与

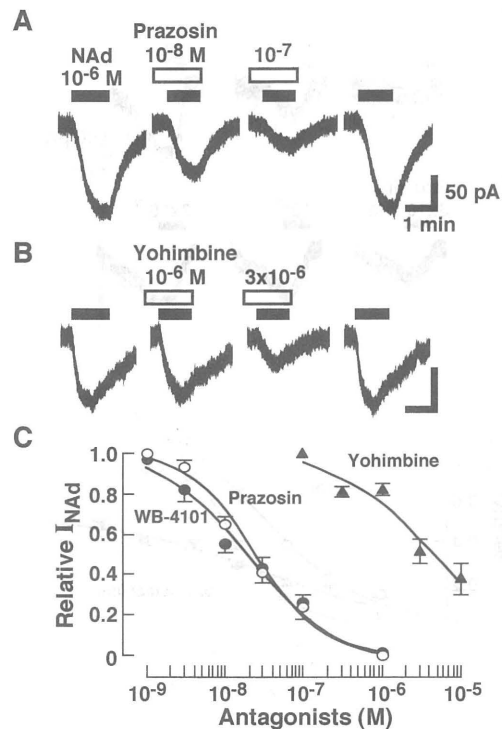


図3 NAd誘発内向き電流に対する prazosin, WB-4101, yohimbine の影響。
A. 10^{-6} M NAd によって惹起される内向き電流が、 10^{-8} と 10^{-7} M の prazosin 存在下において、いかに抑制されるかを示す。NAd は 10 分ごとに 1 分間投与した。Prazosin は NAd を投与する 30 秒前から投与した。
B. 10^{-6} M NAd によって惹起される内向き電流に対する yohimbine の 10^{-6} と 3×10^{-6} M の抑制効果を示す。yohimbine は NAd 投与の 30 秒前に前処置した。
C. prazosin, WB-4101, yohimbine の、NAd 応答に対する濃度抑制曲線である。縦軸は 10^{-6} M NAd 単独で誘発される内向き電流に対するアンタゴニスト存在下での NAd 誘発電流の比率として示す。

時の電流値から投与前の電流値を引く (b-a) ことで、NAd によって惹起される電流の電位依存性が分かる。NAd の引き起こす内向き電流は -40 mV より過分極側では次第に減少したが、電流が逆転して外向き電流となることはなかった。ムスカリン作動性 K^+ 電流 ($I_{K(M)}$ または M 電流) は、 -70 mV よりも過分極側の電位では流れない事が知られており、この実験から

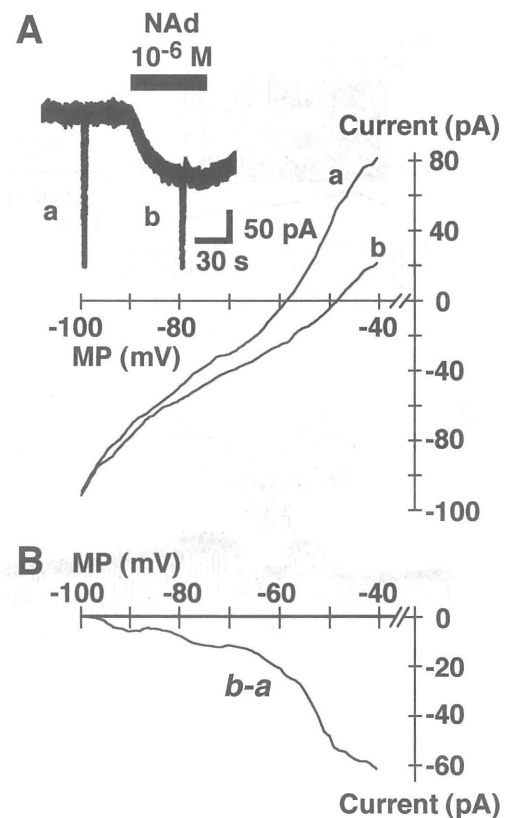


図4 NAd の電流電圧曲線 (I-V)。
A. I-V は ramp-clamp 法を用いて、 10^{-6} M NAd を投与前と投与中に観察した。膜電位は -25 mV に保持し、過分極性の ramp 波を与え、膜電位を 3 秒間に -40 から -100 mV へ変化させた。(a) は NAd を投与前、(b) は NAd を投与中。挿入図は NAd によって惹起された電流を示す。
B. 10^{-6} M NAd を投与したときの I-V から、NAd を与える前の I-V を引いたもの。

NAd のニューロンに対する作用は $I_{K(M)}$ を抑制した結果と考えられる。

4. M 電流への NAd の効果

NAd が M 型 K^+ チャネルに作用していることをさらに明らかにするために、ニューロンに 800 ms の過分極矩形波を電位固定下にて与えて、電気緊張電位を測定した。図 5 A の X, Y で示した部分が $I_{K(M)}$ に相当し、 $I_{K(M)}$ の振幅は保持電位を -25 から -50 mV まで変化させた時の、時間に依存して変化する内向き電流

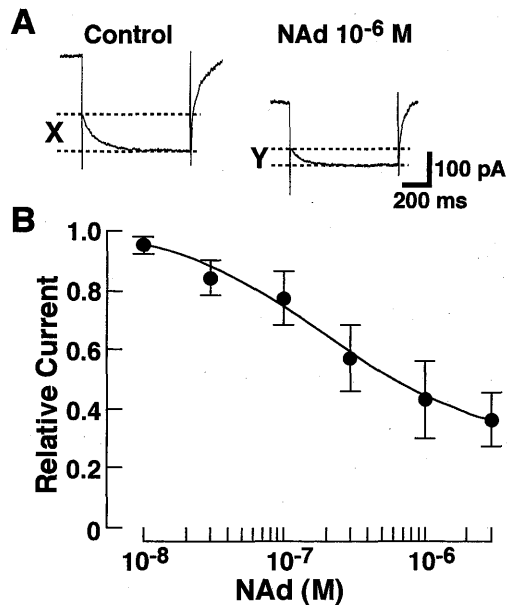


図5 NAdによるM電流の抑制。

A. 10⁻⁶ M NAdを投与前と、投与後におけるM電流の変化を示す。M電流の不活性化は、NAd投与前(X)と投与した(Y)をそれぞれ比較することで観察した。

B. NAdの濃度を高くすることにより、M電流の不活性化がより著明になった。

として計測した。図5 Bに、NAdによる $I_{K(M)}$ の濃度依存的抑制を示す。NAdの $I_{K(M)}$ 抑制作用の IC_{50} は $2.0 \times 10^{-7} M$ であり、最大抑制率は71%であった。

考 察

自律神経節ニューロンにおいて、 α_1 受容体の活性化は脱分極応答を惹起し、 α_2 受容体の活性化は過分極を起すとして一般に考えられている³⁾⁵⁾⁸⁾²²⁾。今回用いたラット傍気管神経節ニューロンにおいても、ReekieとBurnstockは、気道組織標本での細胞内記録により、NAdがニューロンを脱分極させると報告している²¹⁾。本研究の結果は彼らの結果と一致し、さらにNAdが直接傍気管神経節ニューロンを脱分極させることが明らかとなった。すなわち、本研究で用いた単離ニューロンには膜のイオンチャネル活性を変化させる入力がないことから、NAdは本ニューロンを直接興奮させると考えられる。

膜電位固定下にNAdを投与すると、保持電位-40

mVで膜コンダクタンスの減少を伴った内向き電流が惹起された(図2 A)。NAdで誘発される内向き電流の電流電圧関係を調べると、過分極側では電流値が減少し、逆転電位が K^+ の平衡電位と一致するかと思えた。しかし、NAd誘発電流が逆転して外向き電流になることはなかった。中枢および末梢のニューロンでは、 $I_{K(M)}$ は-70 mVより過分極側の電位では不活性化していることが知られている⁸⁾。従って、NAdは傍気管神経節ニューロンのM型 K^+ チャネルを抑制していると考えられた。事実、図5に示すように、NAdは傍気管神経節ニューロンの $I_{K(M)}$ を濃度依存的に抑制し、その IC_{50} 値は $2.0 \times 10^{-7} M$ であった。この値はNAdが誘発する内向き電流の EC_{50} 値とほぼ一致した。M電流は様々なG蛋白を介する受容体により抑制される¹⁶⁾、NAdがM電流を抑制するという事はこれまで報告されておらず、本研究が初めての報告である。

α_1 アゴニストであるcirazolineはNAdと同様に内向き電流を惹起し、 α_1 アンタゴニストであるprazosinはNAd誘発電流を抑制したことから、NAdの応答に α_1 アドレナリン受容体が関与するということが明らかになった。 α_2 アンタゴニストと知られているyohimbineもまたNAdが惹起する内向き電流を抑制したが、yohimbineは高濃度では α_2 アドレナリン受容体だけでなく α_1 アドレナリン受容体にも作用することが報告されている²⁴⁾。 α_1 アドレナリン受容体はG蛋白質共役型受容体であり、これまで、3つの α_1 アドレナリン受容体(α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})がクローニングされている。oxymetazolineは培養細胞に発現した α_{1A} アドレナリン受容体サブタイプをパーシャルではあるが、選択的に活性化することが報告されている²⁰⁾。本研究において、oxymetazolineはパーシャルアゴニストとして作用した。またNAd応答は α_{1A} アンタゴニストWB-4101によって抑制された(図3)。従って、ラット傍気管神経節ニューロンではNAdの応答に α_{1A} アドレナリン受容体が関与していると考えられる。

本研究により傍気管神経節ニューロンの細胞体に α_{1A} アドレナリン受容体が存在することが明らかとなった。高濃度のNAdを用いても脱感作は認められなかったことから、NAdはM電流の抑制のみによる脱分極を誘発し、活動電位の脱分極性ブロックは起こさないことが示唆された。一方、NAdはイヌの気管に

において、コリン作動性入力を減少させ、気管平滑筋の収縮を抑制することが報告されている¹³⁾。また、交感神経を刺激すると副交感神経刺激によるモルモットおよびイヌ気管平滑筋の収縮は減少するという⁷⁾¹⁵⁾。これらの効果はNAdが節前受容体を介して気道コリン作動性神経終末からのACh遊離を抑制した結果であり⁹⁾¹⁰⁾¹⁷⁾²³⁾、これには α_2 アドレナリン受容体が関与していると考えられている²⁵⁾。すなわち、傍気管神経節ニューロンの細胞体には α_{1A} アドレナリン受容体が、一方の神経終末部には α_2 アドレナリン受容体が存在し、NAdは作用する部位によって下気道の機能に複雑な影響を与えることが出来ると考えられた。

最後に、ラット傍気管神経節ニューロンにおいて、NAdは α_{1A} アドレナリン受容体を介してM型K⁺チャネルを抑制することにより脱分極応答を惹起すると結論出来る。NAdによる脱分極は、気道において気道副交感神経節ニューロンの興奮を上昇させることにより中枢神経系から気道への迷走神経入力を一時的に増幅する可能性がある。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究のご指導をいただきました石橋 仁講師、赤池 紀生教授、並びに伊東 祐之教授、さらに本研究の遂行にご協力いただいた九州大学大学院細胞・システム生理学の先輩方に深く感謝します。

文 献

- 1) Aibara K, S and Akaike N: (1992) Voltage-dependent ionic currents in dissociated paratracheal ganglion cells of the rat. *J. physiol. (Lond.)* 475: 591-610.
- 2) Akaike N and Harata N: (1994) Nystatin perforated patch recording and its applications to analysis of intracellular mechanisms. *Jpn. J. Physiol.* 44: 433-473.
- 3) Akasu T, Gallagher JP, Nakamura T, Shinnick-Gallagher P and Yosimura M: (1985) Noradrenaline hyperpolarization and depolarization in cat vesical parasympathetic neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 361: 165-184.
- 4) Akasu T, Tsurusaki M and Tokimasa T: (1990) Reduction of the N-type calcium current by noradrenaline in neurons of rabbit vesical parasympathetic ganglia. *J. Physiol. (Lond.)* 426, 436-452.
- 5) Ashe JH and Libet B: (1982) Pharmacological properties and monoaminergic mediation of the slow IPSP, in mammalian sympathetic ganglia. *Brain Res.* 424: 345-349.
- 6) Branes PJ, Chung KF and Page CP: (1998) Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.* 50: 515-595.
- 7) Cabezas GA, Graz PD and Nadel JA: (1971) Sympathetic versus parasympathetic nervous regulation of airways in dogs. *J. Appl. Physiol.* 31: 651-655.
- 8) Constanti A and Brown DA: (1981) M-currents in voltage-clamped mammalian sympathetic neurons. *Neurosci. Lett.* 24: 289-294.
- 9) Grundström N and Andersson RGG: (1985) Inhibition of the cholinergic neurotransmission in human airways via prejunctional α_2 -adrenoceptors. *Acta Physiol. Scand.* 125: 513-517, 1985.
- 10) Grundström N, Andersson RGG and Wikberg JES: (1981) Prejunctional α -adrenoceptors inhibit contraction of tracheal smooth muscle by inhibiting cholinergic neurotransmission. *Life Sci.* 28: 2981-2986.
- 11) Hakoda H and Ito Y: (1990) Modulation of cholinergic neurotransmission by peptide VIP, VIP antiserum and VIP antagonists in dog and cat trachea. *J. Physiol. (Lond.)* 458: 133-154.
- 12) Ishibashi H, Mochidome T, Okai J, Ichiki H, Shimada H and Takahama K: (2001) Activation of potassium conductance by ophiopogonin-D in acutely dissociated rat paratracheal neurons. *Br. J. Pharmacol.* 132: 461-466.
- 13) Ito Y and Tajima K: (1982) Dual effects of catecholamines on pre- and post-junctional membranes in dog trachea. *Br. J. Pharmacol.* 75: 433-440.
- 14) Jing L, Inoue R, Tashiro K, Takahashi S and Ito Y: (1995) Role of nitric oxide non-adrenergic, non-cholinergic relaxation and modulation of excitatory neuroeffector transmission in the cat airway. *J. Physiol. (Lond.)* 483: 225-237.
- 15) McCaig DJ: (1987) Effects of sympathetic stimulation and applied catecholamines on mechanical and electrical responses to stimulation of the vagus nerve in guinea-pig isolated trachea. *Br. J. Pharmacol.* 91: 385-394.
- 16) Marrion NV: (1997) Control of M-current. *Annu. Rev. Physiol.* 59: 483-504.
- 17) Meir A, Ginsburg S, Butkevich A, Kachalsky SG, Kaserman I, Ahdut R, Demircoren S and Rahamimoff R: (1999) Ion channels in presynaptic

never terminals and control of transmitter release. *Pharmacol. Rev.* 79: 1019-1088.

18) Myers A and Undem B: (1993) Electrophysiological effects of tachykinins and capsaicin on guinea-pig bronchial parasympathetic ganglion neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 470: 665-679.

19) Myers A, Undem B and Kummer W: (1996) Anatomical and electrophysiological comparison of the sensory innervation of bronchial and tracheal parasympathetic ganglion neurons. *J. Auton. Nerv. Syst.* 61: 162-168.

20) Obita K, Shibata K, Horie K, Fogla R, Kimura K and Tsujimoto G: (1995) NS-95, a novel $\alpha 1A$ -adrenoceptor-selective agonist characterization using recombinant human $\alpha 1$ -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 291: 327-334.

21) Reekie FM and Burnstock G: (1992) Effects of noradrenaline on rat paratracheal neurons and localization of an endogenous source of noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* 107: 471-475.

22) Suzuki T and Volle RL: (1979) Nicotinic, muscarinic and adrenergic receptors in a parasympathetic ganglion. *J. Pharm. Exp. Ther.* 211: 251-256.

23) Thompson DC, Diamond L and Altieri RJ: (1990) Presynaptic alpha adrenoceptor modulation of neurally mediated cholinergic excitatory and nonadrenergic noncholinergic inhibitory responses in guinea-pig trachea. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 254: 306-311, 1990.

24) Ysuru H, Shoji T and Shigei T: (1983) Different modes of action of clonidine on isolated canine veins. *Jpn. J. Pharmacol.* 33: 1089-1091.

25) Yu M, Wang Z and Robinson EN: (1993) Prejunctional $\alpha 2$ -adrenoceptors inhibit acetylcholine release from cholinergic nerves in equine airway. *Am. J. Physiol.* 265: L565-L570.

(受付 2001-10-1)