

モルモット腸壁内在神経叢における
シナプス前および後膜に対する神経ペプチドの作用
Actions of neuropeptides on pre- and post-synaptic membrane
in enteric plexus of guinea-pig

岡田 祐美 OKADA Yumi

(お茶の水女子大学大学院人間文化研究科ライフサイエンス専攻)

1. はじめに

消化管壁内には、脊髄に匹敵する数(1-10億個)の神経細胞が存在し腸神経系を構成している。腸神経系は外縦筋層と内輪筋層の間に位置する筋層間神経叢Auerbach's plexusと粘膜下層に位置する粘膜下神経叢Meissner's plexusの2つの腸壁内在神経叢からなる。腸神経系は、中枢神経系とは自律神経で連絡されているが、この連絡が切断されても消化管の機能を自律的に制御することが可能であり、更に、腸神経系と中枢神経系では、伝達物質も類似しており、それらは脳腸ペプチドと総称される。本研究ではアミノ酸類が相互に酷似している脳腸ペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) と VIP (vasoactive intestinal polypeptide) の腸壁内在神経叢への作用(神経細胞への直接作用とシナプス伝達に及ぼす作用)を検討した。

2. 実験

(1) 標本

モルモット(成熟、雄性、体重250-300g)の頭蓋部を強打した後に頸動脈・頸静脈を切断して放血し、回腸および盲腸を摘出して Krebs 液で腸内物を洗浄除去した。

① 回腸・筋層間神経叢神経節標本

洗浄した回腸を長軸方向に垂直に、回盲弁から10cmの位置(長さ1cm)を切り取りガラス棒に通した後、長軸に平行に漿膜に切れ目を入れた。その切れ目から、脱脂綿を用いて回腸を軽く擦り、筋層間神経叢を含む漿膜・外縦筋からなる膜を一度に剥離した。次いで剥離した膜を筋層間神経叢を上面にして顕微鏡下で灌流槽(1mL)内底面(シリコン内張付)に伸展つつ金属ピン(直径20 μ m)で固定した後、状態の良い1つの神経節(大きさ約100 μ m)の周囲を改めて金属ピン(直径10 μ m)で留め、剃刀で切片(500 μ m \times 1000 μ m)に切り出し、外側を除去した。

② 盲腸・粘膜下神経叢神経節標本

洗浄した盲腸の中央部の結腸紐間を2cm \times 5cmの切片として切り出した後、更にこの切片を1cm \times 1.5cmの小切片として切り出した。次いで実体顕微鏡下で粘膜と粘膜筋板を剥離した後、この小切片を反転して、漿膜輪走筋を順に剥離した。この粘膜下神経叢を含む粘膜下組織標本を灌流槽(シリコン内張付)内底面に粘膜側を上面として金属ピン(直径30 μ m)で固定した。神経節の周囲を改めて金属ピンで留め、神経節表面の結合組織を丁寧に剥離した。

(2) 薬品

脳腸ペプチドとして PACAP27, PACAP38, VIP (ペプチド研究所)を、神経伝達物質として ACh (Acetylcholine) (和光純薬)を、電位依存性 Na⁺チャンネルブロッカーとして TTX (Tetrodotoxin) (三共)を使用した。PACAP 27 と 38 は同様の反応を示したので主に PACAP27 を使用した。

(3) 測定

① 静止膜電位と膜抵抗

Krebs 液(組成(mM)): NaCl 117; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgCl₂ 1.2; NaH₂PO₄ 1.2; NaHCO₃ 2.5; Glc 11.5. pH = 7.4, 36°C, 95% O₂-5% CO₂と平衡)で灌流(3 mL/min)しながら微分干渉顕微鏡(Zeiss)下で神経節中の神経細胞中にガラス微小管記録電極(電極抵抗50-80 M Ω , 尖端径1 μ m以下, 2M KCl 充填)を刺入した。また、銀塩化銀電極を灌流液に浸して対極とし、ガラス微小電極の電位 ϕ を測定し、この細胞膜電位 ϕ に及ぼす灌流液中の PACAP 濃度 c 依存性($c=0-1\mu$ M)を検討した(Fig. 1)。また、前置増幅器(CEZ-3100, 日本光電)のブリッジ回路で、刺入した記録電極より負電流(カソード電流)周期パルス($I=0.1-0.3$ nA, $\Delta t=50-100$ ms, $T=5$ sec)を記録細胞に注入し電気緊張電位 V を起こし、その $I-\phi$ 特性より細胞膜抵抗 R を測定した。TTX (500 nM)存在下でも脳腸ペプチドを灌流投与し、脳腸ペプチドの電位依存性 Na⁺チャンネルへの作用を検討した(Fig. 1)。

② シナプス後電位

ガラス微小管刺激電極(尖端径10 μ m, Krebs液充填)を用いて、神経節間線維表面に負電流(カソード電流)周期パルス($\Delta t=0.3$ ms, $T=10$ sec)を与えて(焦点電気刺激Focal electric stimulation)神経節前細胞を刺激してシナプス後電位を発生し、その大きさから脳腸ペプチドのシナプス伝達への作用を検討した(Fig. 1)。Fast EPSP (excitatory post-synaptic potential)は単発焦点電気刺激によって、IPSP (inhibitory post-synaptic potential)は頻回焦点刺激(10 Hz \times 2)によって発生した。

Fast EPSPを仲介する伝達物質であるACh(0.1 M)をガラス毛細管電極(尖端径5 μ m)に充填し電気泳動法(ejection current=250 nA, $\Delta t=20$ ms, $T=15$ sec, backing current=1 nA)により記録細胞表面へ電気駆出しACh電位を起こし、その振幅からシナプス後膜ニコチン性受容体の感受性を検討した。

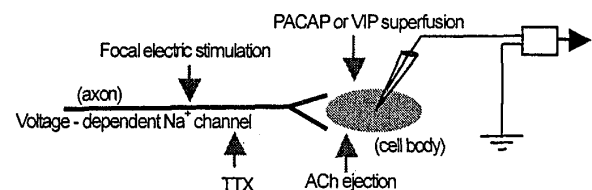


Fig. 1 Schematic diagram of the experimental methods

3. 結果と考察

(1) 神経細胞膜の脱分極

筋層間神経叢神経細胞は Fast EPSP を発生する S 細胞と緩徐な活動電位 (AP: action potential) 後過分極を発生する AH 細胞に分類される。

PACAP の灌流投与により、87% (26/37) の AH 細胞と、57% (4/7) の S 細胞が濃度依存性に脱分極した (脱分極した AH 細胞の 35% は AP を伴った)。同様に、82% (27/33) の粘膜下神経叢神経も PACAP 濃度依存性に脱分極した (そのうち 44% は AP を伴った) (Fig.2)。

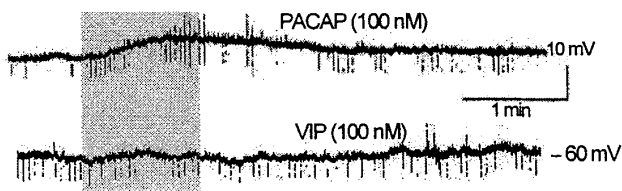


Fig.2 Excitatory effect of PACAP and VIP on Auerbach's plexus AH neuron

AH 細胞のコンダクタンス G ($G=1/R$) は灌流液中の PACAP 濃度 c により減少した。この依存性を、式

$$\frac{1}{\theta} \equiv \frac{\Delta G_{\infty}}{\Delta G} = \frac{K}{c} + 1$$

を用いて、Lineweaver - Burk plot し (Fig.3A), その傾きより PACAP 受容体の基質親和度が $pK = 9.4$ を得た (粘膜下神経叢神経細胞の PACAP 親和度は $pK = 8.2$ であった)。

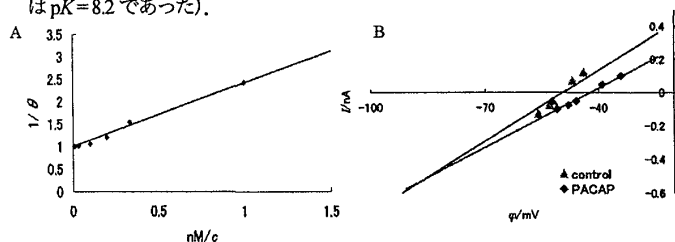


Fig.3 A. Lineweaver - Burk plot of PACAP for Auerbach's plexus AH neuron, B. Current - Voltage characteristic of Auerbach's plexus AH neuron with and without PACAP

(2) 脱分極に関するチャネル

① K^+ チャネル

細胞内毛細管電極で測定した細胞膜の電流 - 電圧特性を Fig.3B に示す。PACAP, VIP 灌流投与により膜抵抗が増大した ($69 M\Omega \rightarrow 84 M\Omega, 100 M\Omega \rightarrow 126 M\Omega$)。グラフの交点より反転電位は $-84 mV$ (VIP は $-93 mV$) と求まり、 K^+ の平衡電位 ($-90 mV$) に近い値となった。

② 電位依存性 Na^+ チャネル

PACAP 灌流投与による脱分極は灌流液に TTX (500 nM) を加えても消失しなかった (Fig.4)。

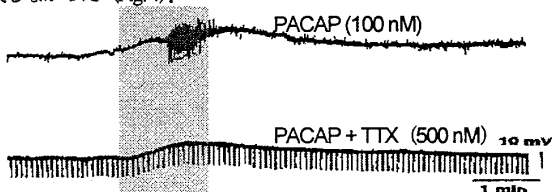


Fig.4 Membrane depolarization by PACAP with and without TTX for Meissner's plexus neuron

(3) シナプス後電位の抑制

① Fast EPSP と Post-synaptic AP の抑制

PACAP, VIP の灌流投与により、シナプス後細胞の ACh 電位の振幅は一定であったが Fast EPSP の大きさは 62% ($8.5 mV \rightarrow 5.3 mV$) になった。また焦点電気刺激によって起こした活動電位の発生が抑制された (Fig.5)。

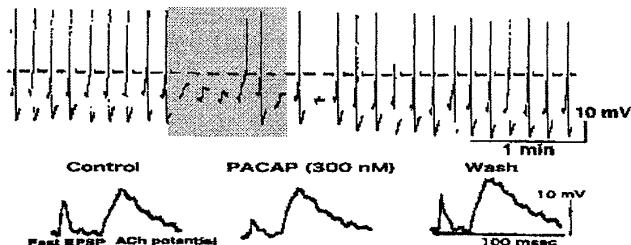


Fig.5 Inhibition of ganglionic transmission by PACAP in Meissner's plexus

② IPSP の抑制

PACAP, VIP の灌流投与により、局所焦点刺激によって起こした IPSP の発生が抑制された (Fig.6)。

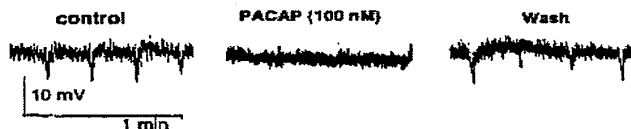


Fig.6 Inhibition of IPSP in amplitude by PACAP in Meissner's plexus

4. おわりに

PACAP はシナプス後細胞膜の K^+ チャネルのコンダクタンスを下げることにより、シナプス後膜を脱分極側にシフトして細胞の興奮性を高めた (筋層間神経叢 $pK = 9.4$, 粘膜下神経叢 $pK = 8.2$)。また、シナプス後膜のニコチン性受容体の感受性は変化させずにシナプス前膜からの ACh の放出を抑制した。

【謝辞】

本実験をご指導下さいました東京医科歯科大学難治疾患研究所 片山芳文教授、平井恵二助教授に深甚なる謝意を表します。

【発表状況】

1. "Actions of neuropeptides on activity of myenteric neurons", 生活工学研究, 7, 48-49 (2005).
2. 「消化管の神経支配」, 生活工学研究, 9, (2007).
3. 「神経導達と神経修飾」, 生活工学研究, 8, 152-155 (2006).
4. 「ATP 合成の進化」, 生活工学研究, 7, 212-215 (2005).
5. 「G 蛋白質結合型受容体を介する信号伝達」, 生活工学研究, 6, 234-235 (2004).
6. "Actions of PACAP on the pre- and post-synaptic membrane in the submucosal plexus of the guinea-pig caecum", 第 84 回日本生理学会大会, 3PIP-029, 2007 年 3 月, 大阪
7. "Action of PACAP on submucosal neurons of the guinea-pig caecum", 第 83 回日本生理学会大会, IPI-099, 2006 年 3 月, 群馬
8. "Action of PACAP in the myenteric plexus of the guinea-pig ileum", 第 82 回日本生理学会大会, 3P-050, 2005 年 5 月, 宮城
9. 「アウエルバハ神経叢と腸腸ペプチド」, 第 25 回環境生理学研究会, 1-6, 2005 年 9 月, 長野
10. 「消化管の神経系」, 第 24 回環境生理学研究会, 2-11, 2004 年 8 月, 京都