

学 位 論 文 題 名

ラット膵臓腺房細胞における刺激－放出連関
に及ぼす細胞外 pH 変化の影響

学位論文内容の要旨

膵腺房細胞における刺激－放出連関におけるエネルギー供給，細胞内 Ca^{2+} イオン動態についての理解を深めるため，酵素分泌過程および，細胞質内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 動態，ミトコンドリア呼吸にたいする細胞外 pH (pH_o) 変化の影響を調べ，総合的に解析することを目的に，ラット摘出灌流膵標本を用いて，ミトコンドリア内チトクロム酵素酸化還元位，酸素消費量，及び，水および酵素放出を，また，コラゲナーゼ処理によって得たラット膵分離腺房標本を用いて，酵素放出，細胞内 pH (pH_i)，細胞質内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態，細胞内への Ca^{2+} 流入を測定した。

ラット摘出灌流膵標本で，血管灌流液の pH を 7.3 から 6.8 に下降させるとミトコンドリア内チトクロム a (a_3)，b， $c + c_1$ の酸化還元位がすべて酸化方向に変化した。 pH_o を 6.0 にまで下降させるとチトクロム酵素群の酸化変化はより大きくなった。 pH_o を 8.0 へ上昇させるとチトクロム酵素群の還元変化が引き起こされた。BCECF (2, 7 - bis (2 - carboxyethyl) - 5 (6) - carboxyfluorescein) を負荷した分離腺房標本を用いて調べた pH_i は，標準状態 (pH_o , 7.4) においては 7.41 ± 0.03 ($n = 8$) であった。 pH_o 6.2～8.0 の範囲では， pH_i は pH_o 上昇に従ってほぼ直線的に上昇し，その傾きは約 0.3 であった。以上の結果から pH_o 変化に伴って pH_i が変化し，その結果としてミトコンドリア内膜での H^+ 濃度勾配が変化することで，ミトコンドリア内での電子伝達量が変化していることが示唆された。

摘出灌流膵標本を使って膵液，酵素放出反応を調べたところ，刺激開始前の静止時放出は pH_o 6.8 および 6.0 において pH_o 7.3 での放出に比べ有意に低下した。最大放出反応を引き起こす 100pM CCK - 8 持続刺激に応じた放出反応は， pH_o 6.0 または 8.0 において pH_o 7.3 での放出反応に比べて有意に低下した。一方，分離腺房標本の表面灌流実験では， pH_o 6.0 への下降により，100pM CCK - 8 刺激に応じたアミラーゼ放出経過の後半のプラトー部分でのみ抑制が認められ，静止時放出に変化は認められなかった。 pH_o 8.0 への上昇によっては，アミラーゼ放出反応が pH_o 7.4 での放出反応よりもわずかに増大する傾向が認められた。これらの pH_o 変化の放出

反応にたいする効果の違いは、おそらく実験に用いた標本系および実験プロトコルの違いによるものと思われる。

摘出灌流腺房標本では、20pM CCK - 8 刺激に応じた持続性の放出反応の大部分は灌流液から Ca^{2+} を除くことで抑制された。しかし、細胞外液に Ca^{2+} (2.5mM) を戻すと刺激終了後でも放出反応が再び引き起こされた (Ca^{2+} 再導入反応)。分離腺房標本を用いた実験では、100pM CCK - 8 刺激終了後に、pH_i 6.0から標準pH_i (7.4) へ戻すことでアミラーゼ放出反応が再び引き起こされた。この反応は細胞外 Ca^{2+} に依存しており、摘出灌流腺房標本で見られた Ca^{2+} 再導入による放出反応と類似していた。一方、pH_i 8.0において分泌刺激終了後も持続するアミラーゼ放出は、細胞外 Ca^{2+} を除くことで消失した。これらの結果は、低 pH_i 条件下では刺激に応じた腺房細胞への Ca^{2+} 流入が抑制されること、かつ、高 pH_i 条件下では Ca^{2+} 流入が促進されていることを示唆した。

Ca^{2+} 蛍光指示薬である fura - 2 を負荷した分離腺房標本を用いて、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 画像解析装置および、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 顕微測定により腺房細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 動態を調べたところ、分離腺房標本を100pM CCK - 8 で持続刺激したとき、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は最初に急速に最大値に達し (初期相)、続いて緩やかに下降しながら静止時の2~3倍の値を刺激中維持 (二次相) した。pH_i を7.4から6.0へ下降させると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化の初期相に続く緩やかな下降が加速され、刺激持続中にもかかわらず $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時レベルにまで低下した。しかし、pH_i を6.0から7.4へ戻すことで、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は再び上昇して静止時の2倍程度の値に達した。反対に pH_i を8.0へ上昇させると、初期相に続く $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の緩やかな下降が減速され、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激持続中、高い値を維持した。その後、pH_i を7.4に戻すことで $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は速やかに下降した。これらの $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 反応の時間経過は100pM CCK - 8 刺激に応じた分離腺房標本からのアミラーゼ放出の時間経過と相似していた。CCK の生理的濃度である10pM の CCK - 8 持続刺激に応じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動性変動 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動) においては、pH_i の6.0への下降により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ スパイクの頻度が有意に減少し、またスパイクの高さが次第に減衰した。pH_i の8.0への上昇によりいくつかの例で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ スパイク頻度が増大したが pH_i 7.4での反応に比べ有意な差は認められなかった。

分泌刺激に応じた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の二次相上昇および、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 振動が細胞外からの Ca^{2+} の流入により維持されることから、細胞外からの Ca^{2+} 流入にたいする pH_i 変化の影響を、細胞外に添加した Mn^{2+} による340nm 光で励起した fura - 2 の蛍光の消光 (Mn^{2+} 消光法 (Mn^{2+} -quenching)) を目安に調べた。pH_i を6.0へ下降させると、100pM CCK - 8 持続刺激中の Mn^{2+} 流入による消光は pH_i 7.4での消光進行に比べ抑制された。反対に、pH_i 8.0では

Mn²⁺ による消光は促進された。これらの結果は pH_e の下降, 上昇により分泌刺激に応じた腺房細胞内への Ca²⁺ 流入が抑制, または促進されることを示している。10pM CCK - 8 刺激時の Mn²⁺ 流入による fura - 2 蛍光の消光についても, 同様の結果が得られた。

以上の結果に基づいて以下のように推論した。1) pH_e を変化させることで細胞膜で, Na⁺-H⁺ 交換の変化を介して細胞内 H⁺ 濃度の変化がもたらされる。細胞内 H⁺ 濃度変化はミトコンドリア内膜に作用を及ぼし, ミトコンドリアでの電子伝達 (チトクロム酵素酸化還元状態), 酸素消費量の変化が引き起こされる。2) 分泌刺激に応じた細胞内への Ca²⁺ 流入は低 pH_e 条件下では抑制される。反対に, 高 pH_e 条件下では Ca²⁺ 流入は促進される。3) pH_e を下降させた時の膵腺房細胞からの酵素, 電解質放出反応の抑制は, Ca²⁺ 流入が抑制されたことによる [Ca²⁺]_i 上昇の抑制による。

学位論文審査の要旨

主査	教授	菅野 富夫
副査	教授	中里 幸和
副査	教授	斉藤 昌之
副査	助教授	原田 悦守

膵腺房細胞における刺激-放出連関におけるエネルギー供給, 細胞内 Ca²⁺ イオン動態についての理解を深めるために, 酵素分泌過程および, 細胞質内 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_i) 動態, ミトコンドリア呼吸にたいする細胞外 pH (pH_e) 変化の影響を調べた。

ラット摘出灌流膵標本で, 血管灌流液の pH を 7.3 から 6.8 に下降させるとミトコンドリア内チトクロム a (a₃), b, c + c₁ の酸化還元位がすべて酸化方向に変化した。pH_e を 6.0 にまで下降させるとチトクロム酵素群の酸化変化はより大きくなった。pH_e を 8.0 へ上昇させるとチトクロム酵素群の還元変化が引き起こされた。分離腺房標本を用いて細胞内 pH (pH_i) を測定すると, 標準状態 (pH_e 7.4) においては 7.41 ± 0.03 (n = 8) であった。pH_e 6.2 ~ 8.0 の範囲では, pH_i は pH_e 上昇に従ってほぼ直線的に上昇し, その傾きは約 0.3 であった。以上の結果から pH_e 変化に伴って pH_i が変化し, その結果としてミトコンドリア内膜での H⁺ 濃度勾配が変化することで, ミトコンドリア内での電子伝達量が変化していることが示唆された。

摘出灌流膵標本を使って膵液、酵素放出反応を調べたところ、CCK - 8 による刺激開始前の静止時放出は、pH_i6.8および6.0においてpH_i7.3での放出に比べ有意に低下した。最大放出反応を引き起こす100 pM CCK - 8 持続刺激に応じた放出反応は、pH_i6.0または8.0においてpH_i7.3での放出反応に比べて有意に低下した。一方、分離腺房標本の表面灌流実験では、pH_i6.0への下降により、100pM CCK - 8 刺激に応じたアミラーゼ放出経過の後半のプラトー部分でのみ抑制が認められ、静止時放出に変化は認められなかった。pH_i8.0への上昇によっては、アミラーゼ放出反応がpH_i7.4での放出反応よりもわずかに増大する傾向が認められた。

Ca²⁺ 蛍光指示薬である fura - 2 を負荷した分離腺房標本を用いて、[Ca²⁺] 画像解析装置および、[Ca²⁺] 顕微測定により腺房細胞の [Ca²⁺] 動態を調べたところ、分離腺房標本を100 pM CCK - 8 で持続刺激したとき、[Ca²⁺] は最初に急速に最大値に達し（初期相）、続いて緩やかに下降しながら静止時の2～3倍の値を刺激中維持（二次相）した。pH_iを7.4から6.0へ下降させると、[Ca²⁺] 変化の初期相に続く緩やかな下降が加速され刺激持続中にもかかわらず [Ca²⁺] は静止時レベルにまで低下した。しかし、pH_iを6.0から7.4へ戻すことで、[Ca²⁺] は再び上昇して静止時の2倍程度の値に達した。反対にpH_iを8.0へ上昇させると、初期相に続く [Ca²⁺] の緩やかな下降が減速され、[Ca²⁺] は刺激持続中、高い値を維持した。その後、pH_iを7.4に戻すことで [Ca²⁺] は速やかに下降した。これらの [Ca²⁺] 反応の時間経過は100pM CCK - 8 刺激に応じた分離腺房標本からのアミラーゼ放出の時間経過と相似していた。CCK の生理的濃度である10pM の CCK - 8 持続刺激に応じた [Ca²⁺] 振動性変動については、pH_iの6.0への下降により [Ca²⁺] スパイクの頻度が有意に減少し、またスパイクの高さが次第に減衰した。pH_iの8.0への上昇によりいくつかの例で [Ca²⁺] スパイク頻度が増大したがpH_i7.4での反応に比べ有意な差は認められなかった。

以上の結果に基づいて、申請者は次のように推論している。1) pH_iを変化させることで、細胞膜で Na⁺-H⁺交換の変化を介して細胞内H⁺濃度の変化がもたらされる。細胞内H⁺濃度変化はミトコンドリア内膜に作用を及ぼしミトコンドリアでの電子伝達（チトクロム酵素酸化還元状態）、酸素消費量の変化が引き起こされる。2) 分泌刺激に応じた細胞内への Ca²⁺ 流入は低pH_i条件下では抑制される。反対に、高pH_i条件下ではCa²⁺ 流入は促進される。3) pH_iを下降させた時の膵腺房細胞からの酵素、電解質放出反応の抑制は、Ca²⁺ 流入が抑制されたことによる [Ca²⁺] 上昇の抑制による。これらは、膵臓腺房細胞の刺激－放出連関についての新しい見解を含むものであり、審査員一同は浅田尚登氏が博士（獣医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。