

学 位 論 文 題 名

ラット上頸神経節の節伝達におけるムスカリン様M1
受容体サブタイプの機能的役割

学位論文内容の要旨

I 目的

交感神経遠心路の節伝達における責任受容体は主にニコチン様受容体であるが、機能を修飾する様々な因子の存在が知られるようになった。本研究では、その交感神経節伝達調節因子のなかでムスカリン様受容体に焦点を当て、ムスカリン様受容体を介する節伝達調節機構を明かにすることを目的とした。

交感神経節のひとつである上頸神経節から外頸動脈神経が、松果体、甲状腺、副甲状腺等重要な臓器へ投射しており、かつ甲状腺へは濾胞のみならず血管へ多く投射していることが知られている。血流調節を含めその生理的重要性は予想されているものの、機能については不明な点が多くのごさされている。甲状腺血流調節についてはこれまでもアセチルコリンによる一過性の甲状腺血流の増加及び甲状腺静脈から放射性ヨード活性の増加、上頸神経節切除による T_4 の低下の報告もあり、上頸神経節が甲状腺血流調節及び分泌機能に重要な役割を果たしていることが想像される。本研究では、交感神経機能、特に血流調節機能におけるムスカリン様受容体の関与を調べるため、上頸神経節から分枝する外頸動脈神経に着目し、電気生理学的手法により神経活動を解析し、また外頸動脈神経機能の指標として、その支配臓器である甲状腺の血流をレーザードップラー血流計を用いて測定した。

II 対象及び方法

8～14週齢のWistar系雄性ラットをウレタン、 α -クロラロースの腹腔内投与で麻酔し、ガラミンで不動化した後、人工呼吸下に実験した。外頸動脈神経は、外頸動脈に沿って分離し、可久的遠位で切断した。上頸神経節まで逆行性に剥離し、神経節側を白金-イリジウム双極電極にのせ増幅し、パルスカウンターを用いて神経放電を計測した。

甲状腺血流は、針型probeを甲状腺右葉中央部に当て、レーザードップラー血流計で連続記録した。交感神経幹は上頸神経節の尾側で切断し、神経節側を双極電極で電気刺激した。

上頸神経節をNADPH diaphorase染色をおこない、NO synthaseの存在を確認した。

薬物には、比較的選択的M1作動薬(±)-cis-2-methyl-spiro(1,3-oxathiolane-5,3')quinuclidine hydrochloride hemihydrate (AF102B)、選択的M1拮抗薬pirenzepine (PZ)、ニコチン様作動薬dimethylphenylpiperazinium (DMPP)、節遮断薬hexamethonium (C6)、NO synthase 阻害薬N ω -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を用いた。

III 結果

AF102B 10mg/kg 静脈内投与により、血圧は、一過性に低下し、その後約1分の上昇をした後、ほぼ投与前値に戻った。心拍数は一過性の低下の後、約100(拍/分)の増加をし、その後も投与前に比べ頻脈を維持した。外頸動脈神経活動(ECNA)は、AF102B投与直後から著明に増加し、20分までは有意な変化が持続した。これらの血圧及び心拍数の変化は、PZ (100 μ g/kg) の前投与により抑制された。AF102BによるECNAの増加は、PZ前投与により有意に抑制された。

AF102B静脈内投与により甲状腺血流(BF)は増加し、PZ前投与は有意にAF102Bによる甲状腺血流増加反応を抑制した。両側上頸神経節を切除したラットでは、AF102Bの効果は有意に抑制された。

上頸神経節節前枝である交感神経幹の電気刺激は、血圧、心拍数に影響を与えることなく、刺激頻度に依存してBFを減少させた。BFは、電気刺激終了により、速やかに刺激前値に回復したが、PZ前投与は、有意な影響を与えなかった。C6(10mg/kg)前投与は電気刺激によるAF102BによるBF減少を抑制した。

ニコチン様作動薬DMPP投与は、短い持続時間のECNAの発火を起こし、それに伴いBFは減少した。DMPP投与により増加したECNAの発火総数は、C6の前投与により減少した。DMPP投与前のBF平均値を100%とし、最大反応時の値と比較すると、DMPPは用量依存的にBFを減少させ、C6前投与はこれを抑制した。

一方AF102Bによる甲状腺血流の増加作用はC6 10mg/kg前投与により影響を受けなかった。

NO synthase阻害薬L-NAME 5 μ mol/kg投与は、AF102B 10mg/kgによるBFの増加を抑制した。

上頸神経節の細胞体は、NADPH diaphorase染色に陽性であった。このことはNO synthaseが存在する可能性を強く示唆するものである。

IV 考察

本研究では、in vivo での交感神経機能を解析した。外因性に投与された比較的選択的M1作動薬であるAF102Bは、用量依存的に交感神経節後枝である外頸動脈神経活動を増加させ、その支配臓器である甲状腺の血流を増加させた。脊髓破壊ラットにおいても甲状腺血流増加反応を同様に認めた。また、これらの作用が選択的M1拮抗薬であるPZにより拮抗されたことから、上頸神経節においてM1受容体を介する節伝達様式が機能していることが示唆された。甲状腺血流増加は全身的血圧上昇が投与前値に復した後も続いており、上頸神経節切除ラットにおいてもAF102Bによる甲状腺血流増加が減弱したことから単に全身的血圧の変化による反応ではなく外頸動脈神経活動上昇によることを強く示唆する。

交感神経幹を電気刺激した際の甲状腺血流に対する効果はAF102B投与時と異なり、減少した。またニコチン様受容体作動薬を適用した場合も甲状腺血流は減少し、電気刺激時の結果に極めて類似していた。これら血流減少作用はC6を前投与することによって消失したことから、ニコチン様受容体を介した現象であることを強く示唆する。生理的には交感神経節興奮はニコチン様受容体を介して血流減少方向に働いていると考えられる。

NO synthase阻害薬L-NAMEは、AF102Bの甲状腺血流増加を抑制した。L-NAME自身M1拮抗作用を有するとする報告が有るが、M1拮抗作用を有しないN ω -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) 50 μ mol/kgでも同様の結果であった。

上頸神経節におけるM1受容体存在部位は、C6前投与をしてもAF102Bによる甲状腺血流増加作用は影響を受けなかったことから、上頸神経節シナプス内とは考えにくく、シナプス外と考えられる。また、C6を前投与してもAF102Bの甲状腺血流増加は変わりがなかったことから、ニコチン様受容体とM1受容体はそれぞれが独立して機能しているものと考えられる。

V 結語

本研究結果から、ラット上頸神経節伝達機構にムスカリン様受容体が関与し、その支配臓器における血流調節を担っていると考えられ、その効果発現にNOが関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 秀 哉
副 査 教 授 菅 野 盛 夫
副 査 教 授 福 島 菊 郎

学 位 論 文 題 名

ラット上頸神経節の節伝達におけるムスカリン様M1 受容体サブタイプの機能的役割

上頸神経節が甲状腺血流調節及び分泌機能に重要な役割を果たしていることが想像される。本研究では、交感神経機能、特に血流調節機能におけるムスカリン様受容体の関与を調べるため、上頸神経節から分岐する外頸動脈神経に着目し、電気生理学的手法により神経活動を解析し、また外頸動脈神経機能の指標として、その支配臓器である甲状腺の血流をレーザードップラー血流計を用いて測定した。

8～14週齢のWistar系雄性ラットをウレタン、 α -クロラロースの腹腔内投与で麻酔し、ガラムインで不動化した後、人工呼吸下に実験した。外頸動脈神経は、外頸動脈に沿って分離し、可久的遠位で切断した。上頸神経節まで逆行性に剥離し、神経節側を白金-イリジウム双極電極にのせ増幅し、パルスカウンターを用いて神経放電を計測した。甲状腺血流は、針型probeを甲状腺右葉中央部に当て、レーザードップラー血流計で連続記録した。交感神経幹は上頸神経節の尾側で切断し、神経節側を双極電極で電気刺激した。上頸神経節をNADPH diaphorase染色をおこない、NO synthaseの存在を確認した。選択的M1作動薬(±)-cis-2-methyl-spiro (1, 3-oxathiolane-5, 3') quinuclidine hydrochloride hemihydrate (AF102B) 10mg/kg 静脈内投与により、外頸動脈神経活動(ECNA)は、AF102B投与直後から著明に増加し、20分までは有意な変化が持続した。AF102BによるECNAの増加は、選択的M1拮抗薬pirenzepine前投与により有意に抑制された。AF102B静脈内投与により甲状腺血流は増加し、pirenzepine前投与は有意にAF102Bによる甲状腺血流増加反応を抑制した。両側上頸神経節を切除したラットでは、AF102Bの効果は有意に抑制された。AF102Bによる甲状腺血流の増加作用は節遮断薬hexamethonium (C 6)、10mg/kg前投与より影響を受けなかった。

NO synthase阻害薬N^ω-monomethyl-L-arginine (L-NAME) 5 μ mol/kg 投与は、AF102B 10mg/kg による血流量の増加を抑制した。上頸神経節の細胞体は、NADPH diaphorase染色に陽性であった。このことはNO synthaseが上頸神経節に存在する可能性を強く示唆するものである。

本研究では、外因性に投与された比較的選択的M1作動薬であるAF102Bが、用量依存的に交感神経節後枝である外頸動脈神経活動を増加させ、その支配臓器である甲状腺の血流を増加させた。脊髄破壊ラットにおいても甲状腺血流増加反応を同様に認めた。また、これらの作用が選択的M1拮抗薬であるpirenzepineにより拮抗されたことから、上頸神経節においてM1受容体を介する節伝達様式が機能していることが示唆された。また、甲状腺血流増加は外頸動脈神経活

動上昇によることを強く示唆する。NO syntase阻害薬L-NAMEは、AF102Bの甲状腺血流増加を抑制した。L-NAME自身M1拮抗作用を有するとする報告があるが、M1拮抗作用を有しないL-NMMA 50 μ mol/kgでも同様の結果であった。

本研究結果から、ラット上頸神経節伝達機構にムスカリン様M1受容体が関与し、その支配臓器における血流調節を担っていると考えられ、その効果発現にNOが関与することが示唆された。

審査にあたって、福島菊郎教授より(1)ニコチン性にも、ムスカリン性にも外頸動脈神経が興奮するにもかかわらず、異なる作用を示している。この現象について中枢性調節機構が存在するのか。(2)電気刺激によりM1受容体も興奮するのではないのか。の質問があった。菅野盛夫教授からは(1)C6とM1受容体との相互作用の可能性は無いのか。(2)AF102BのM1受容体選択性の程度はどうか。(3)AF102Bによる心拍数の増加の機序は何か。(4)血流増加により甲状腺機能への効果はどうか。(5)交感神経とNO作動性神経との関係をどう考えるか。などの質問があった。齋藤秀哉教授からは(1)AF102Bによる一過性の心拍数低下は、M2受容体が興奮した結果ではないのか。(2)AF102Bの用量と効果の関係はどうか。(3)ムスカリン様受容体サブタイプの構造と情報伝達系について。(4)AF102Bによる一過性の昇圧反応の機序の質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね妥当な回答を行なった。

審査員一同は、「上頸神経節の節伝達におけるムスカリン様M1受容体サブタイプの機能的役割を明かにした」本研究の成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。