

学位論文題名

モルモット副腎髄質細胞からのカテコールアミン  
放出に対するタクリンの作用に関する研究

—コリンエステラーゼ阻害薬フィゾスチグミンとの比較—

学位論文内容の要旨

1. モルモット灌流副腎標本と分離副腎髄質細胞を用いて、アセチルコリン刺激によるカテコールアミン放出に対するタクリンとフィゾスチグミンの作用を調べた。また、副腎ホモジェネートのコリンエステラーゼ活性、及びホールセルボルテージクランプ法によるイオンチャンネル電流の解析によりタクリンとフィゾスチグミンの作用機序について検討した。
2. タクリンとフィゾスチグミンは、アセチルコリン刺激 ( $50 \mu\text{M}$ ) による灌流副腎標本からのカテコールアミン放出に対して二相性の作用を示した。すなわち、低濃度のタクリン ( $0.1-10 \mu\text{M}$ ) 及びフィゾスチグミン ( $0.2-20 \mu\text{M}$ ) はアセチルコリンによるカテコールアミン放出を増強し、高濃度のタクリン ( $100 \mu\text{M}$ ) 及びフィゾスチグミン ( $200 \mu\text{M}$ ) は、アセチルコリンによるカテコールアミン放出をそれ以上増強することなく、むしろ減少させた。
3. コリンエステラーゼによって分解されないカルバコール ( $50 \mu\text{M}$ ) による灌流副腎標本からのカテコールアミン放出は、低濃度タクリン ( $1 \mu\text{M}$ ) 及びフィゾスチグミン ( $2 \mu\text{M}$ ) によって増強されなかった。一方、高濃度タクリン ( $100 \mu\text{M}$ ) 及びフィゾスチグミン ( $200 \mu\text{M}$ ) は、カルバコールによるカテコールアミン放出を著明に抑制した。
4. 副腎ホモジェネートのコリンエステラーゼ活性をタクリンとフィゾスチグミンは濃度依存性に抑制し、 $10 \mu\text{M}$  タクリン及び  $20 \mu\text{M}$  フィゾスチグミンでその活性は完全に消失した。
5. 高濃度タクリン ( $100 \mu\text{M}$ ) とフィゾスチグミン ( $200 \mu\text{M}$ ) は、ニコチン ( $50 \mu\text{M}$ ) による灌流副腎標本からのカテコールアミン放出を抑制した。両薬物はまた、分離副腎髄質細胞からのニコチンによるカテコールアミン放

出を濃度依存性に抑制し、100  $\mu$  M でほぼ完全に消失させた。50%抑制濃度はともに約 10  $\mu$  M であった。

6. 膜電位固定した分離副腎髄質細胞において、ニコチン (50  $\mu$  M) による内向き電流は、タクリンとフィゾスチグミンにより濃度依存性に抑制され、100  $\mu$  M タクリン及び 200  $\mu$  M フィゾスチグミンにより完全に消失した。両薬物はともに、ニコチン電流の一過性のピークよりも、持続相に対して、より強い抑制作用を示した。
7. タクリン (100  $\mu$  M) は、ベラトリジン (20  $\mu$  M) による分離副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出を濃度依存性に抑制した。一方、フィゾスチグミン (1-100  $\mu$  M) はベラトリジンによるカテコールアミン放出にほとんど影響を与えなかった。両薬物の 1 mM は、それ自身で分離副腎髄質細胞から有意なカテコールアミン放出を起こしたが、ベラトリジンによるカテコールアミン放出は、タクリンによってほぼ完全に消失し、フィゾスチグミンによっても約 50%抑制された。
8. 高濃度カリウム (46.2 mM) による分離副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出は、1-100  $\mu$  M のタクリンとフィゾスチグミンによって影響を受けなかった。1 mM では、タクリンの場合、それ自身が高濃度カリウムとほぼ同程度のカテコールアミン放出を起こし、さらに高濃度カリウムを加えても、カテコールアミン放出はそれ以上増加することはなかった。フィゾスチグミンの場合も、それ自身でわずかに有意なカテコールアミン放出を起こしたが、高濃度カリウムによる放出反応には影響を与えなかった。
9. 膜電位固定した分離副腎髄質細胞において、タクリンは濃度依存性に電位依存性ナトリウム及びカルシウム電流を抑制し、300  $\mu$  M で電位依存性ナトリウム電流を、1 mM で電位依存性カルシウム電流を 90%以上抑制した。フィゾスチグミンもまた、濃度依存性に電位依存性のナトリウム及びカルシウム電流を抑制したが、その作用はタクリンより弱く、抑制率は 1 mM で電位依存性ナトリウム電流に対して約 60%、電位依存性カルシウム電流に対して約 35%であった。
10. 以上の結果から、モルモット副腎髄質細胞において、低濃度のタクリンとフィゾスチグミンは、コリンエステラーゼ阻害作用によってアセチルコリンによるカテコールアミン放出を増強することが明らかとなった。一方、高濃度の両薬物は、ニコチン受容体の遮断によって、ニコチンによるカテコールアミン放出を、電位依存性ナトリウムチャンネルの遮断によってベラトリジ

ンによるカテコールアミン放出を抑制すると考えられる。抑制の力価は、ニコチン受容体 > 電位依存性ナトリウムチャンネル > 電位依存性カルシウムチャンネルの順序で、ニコチン受容体に対する抑制は両薬物とも同程度であるが、電位依存性ナトリウムチャンネル及びカルシウムチャンネルに対する抑制はタクリンの方が強いことが明らかとなった。ニコチン受容体に対するタクリンとフィゾスチグミンの抑制作用は、アセチルコリンによるカテコールアミン放出に対する抑制作用発現の主要なメカニズムの一つであると考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 中 里 幸 和  
副 査 教 授 斉 藤 昌 之  
副 査 教 授 葉 藤 芳 昭  
副 査 助 教 授 太 田 利 男

学 位 論 文 題 名

## モルモット副腎髄質細胞からのカテコールアミン 放出に対するタクリンの作用に関する研究

— コリンエステラーゼ阻害薬フィゾスチグミンとの比較 —

1. モルモット灌流副腎標本と分離副腎髄質細胞を用いて、アセチルコリンによるカテコールアミン放出に対するタクリンとフィゾスチグミンの作用と機序について調べた。
2. アセチルコリン ( $50 \mu\text{M}$ ) による灌流副腎標本からのカテコールアミン放出は、低濃度のタクリン ( $0.1\text{--}10 \mu\text{M}$ ) 及びフィゾスチグミン ( $0.2\text{--}20 \mu\text{M}$ ) によって増強されたが、それぞれ  $100 \mu\text{M}$  と  $200 \mu\text{M}$  の高濃度によっては抑制された。カルバコール ( $50 \mu\text{M}$ ) とニコチン ( $50 \mu\text{M}$ ) による放出は、低濃度の両薬物によって増強されず、高濃度で著明に抑制された。分離副腎髄質細胞を用い、ニコチンによる放出に対するタクリンとフィゾスチグミンの50%抑制濃度を調べたところ、ともに約  $10 \mu\text{M}$  であった。
3. タクリンとフィゾスチグミンは、副腎ホモジェネートのコリンエステラーゼ活性を濃度依存性に抑制し、それぞれ  $10 \mu\text{M}$  と  $20 \mu\text{M}$  でその活性を完全に消失させた。
4. 分離副腎髄質細胞からのベラトリジン ( $20 \mu\text{M}$ ) によるカテコールアミン放出は、タクリン ( $1\text{--}100 \mu\text{M}$ ) で濃度依存性に抑制されたが、フィゾスチグミンは殆ど無効であった。一方、高濃度カリウム ( $46.2 \text{mM}$ ) による放出は、 $1\text{--}100 \mu\text{M}$  のタクリンとフィゾスチグミンによって影響を受けなかった。 $1 \text{mM}$  では、タクリン自身が高濃度カリウムとほぼ同程度のカテコールアミン放出を起こし、さらに高濃度カリウムを加えても放出はそれ以上増加することはなかった。フィゾスチグミンもまた  $1 \text{mM}$  でわずかにカテコールアミン放出を起こしたが、高濃度カリウムの効果には影響を与えなかった。
5. 膜電位固定した副腎髄質細胞において、タクリンとフィゾスチグミンは、ニコチンによる内向き電流 > 電位依存性ナトリウム電流 > 電位依存性カルシウム電流の順に、濃度依存性に抑制した。また、両薬物はニコチン電流を同程度の力価で抑制したが、電位依存性ナトリウム電流及びカルシウム電流はタクリンの方が強く抑制した。
6. 以上の結果から、モルモット副腎髄質細胞において、低濃度のタクリンとフィゾスチグミンは、コリンエステラーゼ阻害作用によってアセチルコリンによるカテコール

アミン放出を増強することが明らかとなった。一方、高濃度の両薬物は、主にニコチン受容体の遮断によってニコチン及びアセチルコリンによるカテコールアミン放出を抑制すると考えられる。

以上の結果は、カテコールアミン放出に対するタクリンの作用とその機序に関して多くの新知見を提供しており、審査委員一同、菅原 武氏は、博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。