

学 位 論 文 題 名

副腎髄質細胞及び PC12細胞における
カテコールアミンと ATP 放出のオンライン同時測定

学位論文内容の要旨

交感神経終末や副腎髄質細胞は分泌小胞中にカテコールアミンとATPを含んでいる。これらの細胞から刺激により放出される両物質をオンラインで同時に測定する方法の開発を試みた。この方法を用い、培養ブタ副腎髄質細胞及びラットクロム親和性細胞腫のセルラインであるPC12細胞から放出されるカテコールアミンとATP量を調べ、以下の成績を得た。

1. ATPは精製ルシフェラーゼとルシフェリンを用いてATP発光測定器により、カテコールアミンは電気化学検出器によりオンラインで同時測定する方法を開発した。
2. 表面灌流した培養ブタ副腎髄質細胞にアセチルコリン ($20\mu\text{M}$) もしくは高濃度カリウム (60mM) を適用し、分取した流出液中のカテコールアミン及びアデニンヌクレオチドを高速液体クロマトグラフィーで分離定量した。流出液中のカテコールアミンはノルアドレナリン (81%) とアドレナリン (19%) であった。アデニンヌクレオチドの割合はATP : ADP : AMPが1 : 1.3 : 1であった。
3. オンライン同時測定法を用いて、アセチルコリン (0.1mM) もしくは高濃度カリウム (60mM) 刺激による培養ブタ副腎髄質細胞からのカテコールアミンとATP放出を測定した結果、両物質は一過性に放出された。バリウム (5mM) による刺激では、カテコールアミンとATP放出反応は2相性を示し、一過性に増加した後、放出はピークの50%の大きさで持続した。またいずれの刺激においても、カテコールアミンの放出の時間経過はATPのものと類似していた。流出液中に検出されたATPに対するカテコールアミンのモル濃度比 (カテコールアミン/ATP) はアセチルコリンで 10 ± 1 、高濃度カリウムで 12 ± 1 及びバリウムで 12 ± 2 であった。
4. 高濃度カリウムによる繰り返し刺激によっても、流出液中にカテコールアミ

ンとATPが同じ時間経過で放出された。両放出量は繰り返し刺激することにより減衰したが、流出液中のカテコールアミン/ATPは 12 ± 1 だった。

5. PC12細胞から刺激により放出されたカテコールアミンを高速液体クロマトグラフィーで分離定量した結果、その大部分（90%）がドパミンであった。

PC12細胞を用いたオンライン同時測定においても、アセチルコリン、高濃度カリウム及びバリウム刺激によってドパミンとATPが放出され、その時間経過は培養ブタ副腎髄質細胞からのカテコールアミンとATP放出反応と類似していた。また流出液中に放出されたATPに対するドパミンのモル濃度比（ドパミン/ATP）はアセチルコリンで 11 ± 2 、高濃度カリウムで 9 ± 1 及びバリウムで 9 ± 2 であった。

6. 高濃度カリウムによるドパミンとATP放出に対する神経成長因子（NGF-7S；50 ng/ml），デキサメタゾン（ $1 \mu\text{M}$ ），レセルピン（ $0.1 \mu\text{M}$ ）もしくはバフィロマイシンA1（ $0.1 \mu\text{M}$ ）の影響を調べるため、各薬物存在下もしくは非存在下（コントロール）でPC12細胞を2日間培養した。これらの薬物処置で、高濃度カリウムによる細胞内カルシウム濃度変化及び放出されたアデニンヌクレオチドとアデノシン量比は影響を受けなかった。それ故、上記薬物処置によりカルシウム流入機構及びATP分解酵素活性は変化していないことが示唆された。

7. 高濃度カリウム刺激によるドパミンとATP放出量は、NGF-7S処置した細胞とコントロール細胞の間に差はなかった。デキサメタゾン処置細胞では、ドパミン放出量がコントロール細胞に比べ約2倍増加したが、ATP放出量は変化しなかった。一方、レセルピン処置細胞ではドパミン放出が大部分抑制されたが、ATP放出量はコントロール細胞と差は認められなかった。バフィロマイシンA1処置では、ドパミン及びATP放出量ともに有意に減少した。

以上の結果より、本研究で開発したカテコールアミンとATPのオンライン同時測定法を用いることにより、培養ブタ副腎髄質細胞及びPC12細胞からカテコールアミンとATPが、刺激の種類にかかわらず、ほぼ一定のモル濃度比で放出されることが明らかとなった。このことは、両物質が分泌小胞にほぼ一定の比率で存在していることを示唆している。更にPC12細胞を用いてドパミン貯蔵に影響を与える薬物の作用を検討した結果、ATPはドパミン（カテコールアミン）と異なる機構を介して分泌小胞に貯蔵されていること、またATPの分泌小胞への取り込みには、ドパミンと同様にvacuolar ATPaseによって生みだされる小胞膜を介したプロトン勾配が重要であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 教 授 葉 原 芳 昭
副 査 助 教 太 田 利 男

学 位 論 文 題 名

副腎髄質細胞及び PC12細胞における カテコールアミンと ATP 放出のオンライン同時測定

培養ブタ副腎髄質細胞及びラットクロム親和性細胞腫 PC12 細胞から放出されるカテコールアミンと ATP をオンラインで同時に測定する方法を開発し、以下の成績を得た。

1. 表面灌流した培養ブタ副腎髄質細胞に acetylcholine (ACh) もしくは高濃度 KCl を適用すると流出液中のカテコールアミンとアデニンヌクレオチドが増加した。増加したアデニンヌクレオチドの割合 (ATP:ADP:AMP) は 1:1.3:1 であった。
2. ATP は蛍光のルシフェラーゼとルシフェリンを用いて発光を測定することにより、カテコールアミンは電気化学検出器によりオンラインで同時測定した。ACh (0.1mM)、KCl (60mM) 及び BaCl₂ (4mM) 刺激は、副腎髄質細胞から同じ時間経過でカテコールアミンと ATP 放出を引き起こした。検出された ATP とカテコールアミンのモル濃度比 (カテコールアミン/ATP) は ACh で 10 ± 1 、KCl で 12 ± 1 、BaCl₂ で 12 ± 2 であった。KCl による繰り返し刺激によっても、この割合は変化しなかった。
3. PC12 細胞を用いたオンライン同時測定においても、ACh、KCl 及び BaCl₂ 刺激はドパミンと ATP 放出を起こし、その時間経過は培養ブタ副腎髄質細胞からの放出反応と類似していた。
4. 神経成長因子 (NGF-7S; 50ng/ml)、dexamethasone (1 μ M)、reserpine (0.1 μ M) あるいは bafilomycin A1 (0.1 μ M) 存在下で PC12 細胞を 2 日間培養し、KCl によるドパミンと ATP 放出に対する影響を調べた結果、これらの処置は KCl による細胞内 Ca²⁺濃度変化と放出されたアデニンヌクレオチドの割合 (ATP:ADP:AMP) には影響を与えなかった。
5. NGF-7S 処置した細胞では、KCl 刺激によるドパミンと ATP の放出量は無処置細胞の放出量と同じであった。Dexamethasone 処置細胞では、ドパミン放出量が無処置細胞に比べ約 2 倍増加し、reserpine 処置細胞では逆に大部分が抑制された。これらの細胞では ATP の放出量は無処置細胞の放出量とほとんど変わらなかった。Bafilomycin A1 を処置すると

ドパミンと ATP 放出量は有意に減少した。

以上本論文では、カテコールアミンと ATP のオンライン同時測定法を開発し、培養ブタ副腎髄質細胞及び PC12 細胞の分泌小胞内に、ほぼ一定の割合でカテコールアミンと ATP が存在すること、また分泌小胞への ATP の取り込みにはドパミンと同様、小胞膜 H^+ -ATPase によって生みだされる H^+ 勾配が重要であるが、カテコールアミンと異なる経路を介して分泌小胞に取り込まれることが初めて示された。よって審査員一同は、葛西洋平氏は博士（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。