

P-6.

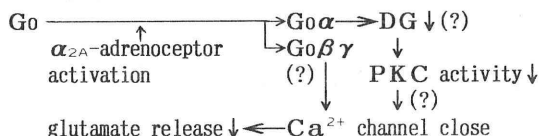
ノルアドレナリンによる興奮性シナプス電流のシナプス前抑制はプロテインキナーゼC (PKC) の活性化によって部分的に拮抗される?

(生理学第一) ○宮崎 武文、小林 春雄  
登坂 恒夫

我々は以前、微分干渉顕微鏡の直視下で同定したラット新生児交感神経節前神経細胞において、周辺刺激によって誘発された興奮性シナプス電流 (EPSC) が、灌流投与されたノルアドレナリン (NA) によって、シナプス前性に抑制されることを報告した。今回NAによるシナプス前抑制の細胞内機構を解析することを目的とした実験を行ったので、その結果を報告する。

1  $\mu$ M フグ毒を含む灌流液中で記録される微小EPSCの平均振幅・平均頻度は、いずれもNA (10  $\mu$ M) の灌流投与によって影響を受けなかった。この素量解析の結果は、「NAはシナプス前性にグルタミン酸放出を抑制し、誘発EPSCの振幅を減少させる。」という以前の結論を支持する結果であると考えられる。素量解析では、NAの作用が見られなかったことから、以下の実験は全て誘発したEPSCについて行なった。クロニジン ( $\alpha_2$  型アドレナリン受容体作動薬、5  $\mu$ M)、オキシメタゾリン ( $\alpha_{2A}$  型部分的作動薬、5  $\mu$ M) はNA (10  $\mu$ M) と同様の抑制作用を示した。フェニレフリン ( $\alpha_1$  型作動薬、100  $\mu$ M) は弱い抑制作用しか示さなかった。アイダゾキサン ( $\alpha_2$  型受容体遮断薬、2  $\mu$ M) 存在下で、EPSCの振幅は増大し、かつNAによる抑制作用は消失した。ヨヒンビン ( $\alpha_2$  型遮断薬) およびブラゾリン ( $\alpha_1$  および  $\alpha_{2B}$  型遮断薬) に関しては、2  $\mu$ M の濃度では抑制作用を阻害する結果は得られず、阻害効果を得るためには、より高濃度 (4~5  $\mu$ M) が必要とされた。1 mM ディブチル環状AMP、10  $\mu$ M フォルスコリン (アデニレート・シクラーゼ活性化薬) および500 nM フォルボール・ディブチレート (PKC活性化薬、PDBu) はいずれもEPSCを有意に増大させたが、PDBuのみがNAによる抑制を部分的にはあるが有意に阻害した (標準灌流液中ではNAによりEPSCの振幅が35%に減少したが、PDBu存在下では62%にまでしか減少しなかった)。

以上の結果から、1) NAは開口放出過程そのものを直接抑制してはいないこと、2) NAの抑制作用に際して、シナプス前終末に存在する  $\alpha_{2A}$  型アドレナリン受容体が活性化されること、3) シナプス前細胞内の環状AMP濃度の減少よりもむしろ、PKC活性の減少が、少なくとも部分的にはNAによる抑制作用に寄与していることが示唆された。今回得られた結果およびこれまでの知見を総合すると、下のようなシナプス前抑制細胞内機構が想像される。



P-7.

リアルタイム画像解析法を用いたアシドーシス状態での神経細胞内Ca<sup>2+</sup>ならびにpHの変動

(麻酔科学教室) ○西元史哉、堀田緒留人  
一色 淳  
(薬理学教室) 原 一恵、劉 力  
渡辺泰雄、渋谷 健

アシドーシス状態における脳神経細胞内Ca<sup>2+</sup>ならびにpHの変動を個々の細胞で同時検索するため、特異的蛍光指示薬を用い、画像解析法によって測定しコンピュータ解析を行った。培養脳神経細胞は、常法通り生後8日令ラットより小脳顆粒細胞を分取し、底に無蛍光ガラスの付いた培養皿で5-7日間培養した。実験日に培養液を除去した後、細胞内Ca<sup>2+</sup>蛍光指示薬であるFura-2/AM、細胞内pH蛍光指示薬であるBCECF/AMを20:1の割合でKrebs-HEPES (KH) 液に混合し、遮光下で37℃、45分インキュベートを行った。その後、蛍光顕微鏡下、画像解析装置 (C-Imaging, Compix INC, USA) で細胞内Ca<sup>2+</sup>は340/380nm、細胞内pHは490/450nmの蛍光比を同時測定し、これらの変動をコンピュータ解析した。尚、アシドーシスの環境設定はKHの液性をpH6.6とすることで行った。結果として、pH7.4 (正常時) では、25 mM KCl の適用により、測定した神経細胞のいずれにおいても同様に細胞内Ca<sup>2+</sup>量の急激な増量が認められ、細胞内pHは、いずれの細胞においてもCa<sup>2+</sup>の増量が生じてから数秒後に低下 (酸性化) し、pHの低下は細胞内Ca<sup>2+</sup>量が基礎値に戻った後も認められた。一方、アシドーシス下でのKCl誘発による細胞内Ca<sup>2+</sup>量の増量は正常群に比較すると40~50%低下し、測定した細胞毎に反応性の相違も認められた。さらに細胞内pHの酸性化の程度もKClによって著明に増強された細胞と比較的緩和な変化を示す細胞の存在が認められた。

以上の成績から、細胞外のアシドーシス状態において神経細胞に存在する電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネル活性は低下し、しかも、脱分極によって細胞内pHの酸性化は進むが、これらの反応を認めにくいアシドーシス耐性細胞の存在することが示唆された。