

氏名	伊 澤 俊 次
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 3203 号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	ラット孤束核の浸透圧受容性ニューロンの受容機構に関する電気生理学的研究
論文審査委員	教授 杉本朋貞 教授 古田裕昭 教授 足立 明

学位論文内容の要旨

【緒言】

体液の浸透圧ホメオスタシスは、生命を維持する上で最も重要な機能の一つであり、その調節系については古くから研究されてきた。最近、孤束核に存在するニューロンのあるものはそれ自身がナトリウムイオンに応答し、体液の浸透圧ホメオスタシス調節系に関与していることが示唆されている。そこで、この孤束核ニューロンについて、最近開発されたホールセルクランプ法を用いて、ナトリウムもしくは浸透圧受容性孤束核ニューロンの受容機構を明らかにするために本研究を行った。

【材料および方法】

- (1)実験動物にはSD系の雄ラット (170~250 g) を用いた。
- (2)断頭後すばやく脳を摘出し4℃の人工脳脊髄液 (aCSF: NaCl; 124, KCl; 5, MgSO₄; 1.3, KH₂PO₄; 1.24, NaHCO₃; 26, CaCl₂; 2.1, Glucose; 10 (mM) 中に、1分間浸漬後、マイクロスライサー (DTK 3000) を用いて、延髄尾側部の孤束核を含む、厚さ400 μmの新鮮脳の前頭断スライス標本作製した。
- (3)スライス標本は35℃のaCSF中で1時間、その後室温で1時間以上インキュベートした後、灌流装置にセットした。
- (4)通常の灌流液は以下のものを用いた。aCSF(Ca⁺⁺free high Mg⁺⁺溶液): NaCl; 121.4, KCl; 3, MgSO₄; 5, NaHCO₃; 26, KH₂PO₄; 1.24, glucose; 6.5(mM)を95% O₂-5%CO₂でバブリングしてpH7.4に保ち、室温にて灌流した。
- (5)電極は二段引きプレーにてホールセル用ガラス微小電極 (10MΩ) を作製し、potassium gluconate; 130, MgCl₂; 1, CaCl₂; 1, EGTA; 10, ATP; 2, HEPES; 10(mM)(pH7.4 with KOH) を電極内液として用いた。

(6) 実体顕微鏡下にて孤束核を同定し,上記ピペットに陽圧をかけながらニューロンに電極先端を接近させ,軽い吸引を行いギガシールを行った。さらに強く吸引し,パッチ膜を破り容量成分を補正し,ホールセル記録が可能な状態にした。

Whole-cell modeにてcurrent clamp下で,等張の人工脳脊髄液(灌流液)をNaCl; ± 5 mM, ± 10 mM, ± 15 mM, ± 20 mMの高張・低張溶液と,Mannitol; $+10$ mM, $+20$ mM, $+30$ mM, $+40$ mMの高張溶液に切り換えて,浸透圧刺激時の放電頻度及び膜電位の変化を記録した。

(7)さらに,電極ピペットを通じてニューロンに3~16kPaの陰・陽圧を加え応答の変化を記録した。

(8)応答の記録と同時に, negative current injection (100mV, 100pA, 100ms, interval; 7sec) により膜抵抗の変化を記録した。

【結果および考察・結論】

1) Ca^{++} free, high Mg^{++} 灌流液を用いてシナプスを介する入力を絶つことにより,孤束核ニューロン自身のNaCl濃度変化に対する応答を調べた結果,孤束核ニューロンのあるものは人工脳脊髄液のNaCl濃度変化に対して応答するものが存在した。

2) 応答様式は多様であったが,NaCl濃度の上昇に対して放電頻度が増加し,NaCl濃度の低下に対して放電頻度の減少するニューロンがもっとも多数存在した。

3) これらのニューロンは灌流液のNaCl濃度変化に対してのみならずmannitolを加えることによって浸透圧を変化させた場合にも同様に応答することから,末梢の内受容器で報告されている Na^+ (ナトリウムイオン) 受容性ではなく,浸透圧受容性であることがわかった。

4) これらの浸透圧に反応する孤束核ニューロンに,陽圧あるいは陰圧をかけることにより細胞膜を伸展あるいは萎縮させると,浸透圧変化に対する応答と同じ反応がみられることから,細胞膜にmechanosensitive ion channelが存在し,浸透圧の刺激でそれが活性あるいは不活性化されることが示唆された。

論文審査結果の要旨

体液の浸透圧ホメオスターシスは、生命維持のために最も重要な機能の一つである。そのために、末梢から中枢神経系に至るまで、いろいろな部位に検出器が存在し、階層的調節機構により厳密に維持されている。本研究は内臓の浸透圧受容器からの1次求心性入力を受け取る孤束核のニューロンのあるものが、それ自身脳脊髄液の浸透圧変化にตอบสนองし、fail safe 機構としての役割を果たしていること、それらには単に浸透圧上昇にตอบสนองして放電頻度を増すタイプだけでなく、多様な応答特性を示すものが存在することを明らかにした。さらに、これらの浸透圧受容性孤束核ニューロンの細胞膜には mechanosensitive ion channel が存在し、浸透圧変化によって2次的にもたらされる、膜の伸展もしくは萎縮による機械的刺激が、引き金となって神経応答を引き起こすことを、ホールセルクランプ法を利用して、細胞に陽圧、陰圧を負荷することにより明らかにした。この研究はさらに歯科領域で重要である、浸透圧による歯痛発現機序の解明に発展させ得る可能性もある。よって本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。