

氏 名 (本籍) 佐 々 木 司

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 2091 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 2 月 22 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 56 年 3 月
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Na-efflux from isolated submucosal gland in
feline trachea.
(ネコ気道単離粘膜下腺に於るNa-efflux)

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 滝 島 任 教 授 西 山 明 徳
教 授 仲 田 祐

論文内容要旨

【目 的】

気道分泌は、気道上皮線毛運動とともに、粘液線毛輸送機構として、吸入異物や病原体の排除、気道内浄化に主要な役割を果たしている。気管支喘息、慢性気管支炎などでは、主に気道の過分泌が粘液線毛輸送能の低下をもたらす気道内粘液貯溜を生ぜしめる。これは気道閉塞のみならず気道感染の誘因となり、時として呼吸不全に至る重大な病態である。一方、このう胞線維症 (cystic fibrosis) では、遺伝的素因に基づく気道分泌の低下が気道浄化能の低下をもたらす、難治性の呼吸器感染症の原因となる。このように、気道分泌の機構及びその制御に関する知識は臨床上重要であるにも関わらず、まだ未解決の問題が残されている。気道分泌物は、大きく分けて、粘液と水 (電解質) からなり、前者は気道上皮内の杯細胞及び粘膜下組織にある粘膜下腺に由来し、一方水分は気道上皮細胞による電解質の能動輸送に伴って分泌されることが明らかにされている。しかし、気道粘膜下腺からの水、電解質の分泌機序に関しては報告が少なく、これまでのところ、腺細胞の分泌に伴う受動的な水分の移動を想定する論文があるのみである。我々は、気管から粘膜下腺を単離することに成功し、これを用いて気道の腺分泌の機序に関して研究してきた。本論文の目的は、この単離粘膜下腺を用い、気道腺に於ける水分、電解質の分泌機序に、能動輸送が関与していることを示すことである。

【方 法】

既に報告している方法により、ネコ気管から粘膜下腺を単離した。10~20ヶの腺を、 $^{22}\text{NaCl}$ (5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) を含んだKrebs生理食塩液 (KRB) で2時間incubateした後、新鮮なKRBで洗浄し、灌流装置に固定した。5% CO_2 /95% O_2 飽和、37°C KRBで2.5ml/minの速度で灌流、18秒間隔でsamplingし流出する ^{22}Na の放射活性を γ -カウンターで測定した。(a): 第1に ^{22}Na の流出曲線のcompartment (comp.) 解析を次の4条件で行い、多指数関数でcurve-fittingを行ない最適値法 (MAICE) でcomp.の数を決めた。(i) 対照粘膜下腺、(ii) ウアブイン (Oua.) 10^{-4}M 処理腺、(iii) K^+ -free処理腺、(iv) 60°C乾燥4時間処理腺、の4条件である。(b): 第2に、種々の薬物に対する反応をみた。各Sampling間隔毎の流出量と組織内 ^{22}Na 濃度をもとに、その時点での流出速度定数 (RC) を求め、薬物投与後の最大RCと投与前のRCとの比をとって、反応の目安とした。(c): 第3に、内因性の神経刺激を目的として、灌流装置に白金板電極を固着し、主として、20V, 20Hz, 0.5msecの矩形波で電場刺激 (FS) を行なった。同時に、種々の拮抗薬を用いた。

【結 果】

(a)compartment analysis : 新鮮粘膜下腺からの ^{22}Na 流出曲線は主として2つの成分からなり、速度定数 K は各々 $K_1=2.25/\text{分}$, $K_2=0.21/\text{分}$ であった。60°C乾燥処理では、流出曲線は片対数スケールで直線となり、 K は、1.98/分と、対照群の K_1 と差がなかった。Oua.処理では K^+ は対照と差がなかったが、 K_2 は0.03/分と対照の K_2 に対して有意に低下していた。同様に、 K^+ -free処理でも K_1 に変化はなく、 K_2 が0.12/分と有意な低下を示した。このことから、 K_1 は、腺組織周囲に附着している ^{22}Na のcomp. を表わし、 K_2 はOua.感受性Na/Kポンプの活性に関連していると考えられた。(b)薬物の効果：コリン作働薬メサコリン (MCh) に対して ^{22}Na 流出は用量依存的に増加し、 10^{-5}M で3.5倍であった。この効果はコリン拮抗薬アトロピン (Atr.) 10^{-6}M で消失した。 α アドレナリン作働薬フェニレフリン (Pheny.) 10^{-5}M も、1.8倍の増強作用を示したが、 β アドレナリン作働薬インプロテレノール (Iso) 10^{-6}M は有意にRCを変化させなかった。MCh及びPheny.の効果はOuaで消失した。(c)FSの影響：FSにより ^{22}Na 流出は周波数依存性に増大し、20V, 20Hz で1.6 倍の有意の増加をみた。 α 拮抗薬フェントラミン (Phent.) 10^{-5}M 及びAtr. でFSの効果は有意に低下し各々1.35倍、1.22倍の増加にとどまったが、これらは、baseline RCよりは有意に高かった。FSの効果はテロドトキシン (10^{-7}M) 又はOua単独あるいはAtr. +Phent.+プロプラノロールの混合投与で完全にblockされた。

【考 察】

今回得られた ^{22}Na 流出の起源は、細胞外及び細胞内に由来するが、細胞内の ^{22}Na 分画は、Na/Kポンプを介している。 β 刺激剤は分泌(粘液の)を有意に増強させ、Oua.は粘液分泌を抑制しないことから、この ^{22}Na は腺腔内に分泌されたものではなく、腺細胞の側基底側膜に存在するNa/Kポンプそのものにより組織液側に汲み出されたものと考えられた。即ち、本実験で得られた ^{22}Na 流出曲線は、Na/Kポンプの活性を示すものである。これは、コリン性及び α アドレナリン性の刺激により活性化され、 β 刺激には有意に応答しない。涙腺・唾液腺・腭外分泌腺などに於る報告と合せると、以上の実験結果は、気道腺に電解水(及び水)の能動輸送による分泌機序が存在することを強く示唆するものである。

審査結果の要旨

気道の粘液と水分の分泌機序に関するこれまでの知見は次のようにまとめられよう。粘液は気道上皮に存在する杯細胞と粘膜下組織による粘膜下腺に由来するが、組織学的な計測では、生理的な状態で粘膜下腺が杯細胞の60倍またはそれ以上の容積を占め、気道内粘液の大部分は粘膜下腺を起源とする。粘膜下腺からの粘液の分泌は、自律神経刺激及び種々のケミカルメディエーターにより亢進し、プロスタグランジンE₂及びステロイドにより抑制される。一方、水・電解質の分泌は、気道上皮細胞からの能動的なCl分泌を指標として研究されており、β刺激剤、プロスタグランジンE₁、E₂、テオフィリンにより亢進する。一方、アセチルコリン、ヒスタミンによってもNaClの分泌は増加するが、これは起電性を示さないとされ粘膜下腺由来であろうと推測されている。気道分泌物の95%は水である。本申請者は、粘膜下腺をネコ気管から単離し、これからのNa⁺イオンの流出速度を種々の条件下に比較することにより、粘膜下腺からの水・電解質の分泌機序の一端を明らかにした。

まず、放射性ナトリウム (²²Na) を負荷した単離粘膜下腺からの²²Na流出曲線の解析から、腺組織の²²Naは細胞内と細胞外の2つのプールから成ることを示した。さらに、細胞内からの²²Na流出は、ウアバイン、K⁺-free下で抑制されることを示し、Na/Kポンプ活性と細胞内からの²²Na流出が密接な関連を有することを示した。次いで、メサコリン、フェニレフリン、イソプロテレノールで刺激すると、前2者では各々3.5倍、1.8倍の流出増加を示したが、イソプロテレノールでは有意な変化を示さなかった。これにより、²²Naの流出と粘液の分泌とは異なった挙動を示すことを明らかにし、本論文での²²Na流出はNa/Kポンプ自体の活性を表わしていると結論した。最後に電場刺激によっても²²Na流出は増加し、内因性の神経伝達物質が粘膜下腺でのNa/Kポンプ活性を調節していることを明らかにした。

従来の気道上皮に於る電解質の移動は、主にUssing型のチェンバーと気道上皮切片を用いて評価されてきており、粘膜下腺からの電解質輸送も同様であった。これは、上皮細胞からの電解質の能動輸送を測定することには有用な方法であることが認められているが、気道の粘膜下組織に埋もれた粘膜下腺に対しても有効な方法であるかどうかは議論のあるところであろう。即ち、もし、腺組織の腺腔側と組織液側との間でVoltage clampが不完全ならば能動輸送の評価は困難となる。これに対し本申請者は、単離粘膜下腺からの電解質流出を測定するという、より直接的な新しい方法により、そのNa/Kポンプの活性化を明らかにした。これは、従来の、粘膜下腺からの電解質分泌は非起電的であるという想定に対して新たに能動輸送の存在を明らかにしたものであり、本論文は気道の分泌生理学に新たなる知見を加えるものとして学位授与に価するものである。