

氏 名（本籍） おか だ み ほ
岡 田 美 穂

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1070 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 3 年 3 月 28 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博士課程) 内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 ラット顎下腺の単離腺房細胞における Na^+/H^+
交換輸送活性化のメカニズム

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 佐 々 木 英 忠
教 授 平 則 夫

論文内容要旨

岡田美穂

【目 的】

酵素反応など、多くの細胞機能は、細胞内pH（以下pHiと略す）に依存性を有する。一方、細胞は酸化的代謝過程により常時酸（Hイオン）を産出するので、Hイオンを緩衝、あるいは細胞外に出してpHiを恒常的に保持する調節機構が存在する。Na/H交換輸送は、pHi調節機構の中でも特に重要である。ラット顎下腺では、ACh刺激によって唾液を分泌するが、Na/H交換輸送の阻害剤amiloride投与下で、刺激を与えると、唾液の分泌が強く抑制されるとの報告があり、刺激-分泌連関においてもNa/H交換輸送が重要な役割を担っていると考えられている。ACh刺激は、イノシトール燐脂質の代謝の促進を介し、唾液腺の腺房細胞内Caイオン濃度（以下Caiと略す）の上昇とprotein kinase C（以下PKCと略す）を活性化する。他の組織においては、PKCによるNa/H交換輸送の促進の報告がみられるが、CaiとNa/H交換輸送の関係については定説がない。唾液腺ではNa/H交換輸送とCai、PKCとの関連については全く研究されていないので、分泌活動時の細胞内pH調節のメカニズムを解明するために本研究を行なった。

【方 法】

200g前後のウィスター系雄ラットを麻酔し、顎下腺を摘出した。腺を細切後コラゲナーゼ処理及びパイペッティング操作により単離腺房を得た。この標本にpH指示蛍光色素BCECF、またはCa指示蛍光色素fura 2のアセトキシメチルエステル 1-2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ を加えて負荷し、その後洗浄して保存した。カバーガラスに細胞接着剤Cell-Takを塗布し、色素負荷標本を接着させた後、灌流用チャンバーに固定し実験を行なった。使用した顕微蛍光測光装置は、落射式蛍光顕微鏡（TMD-EFQ、日本光学社）に自動励起フィルター切り換え装置（三啓社）、SITカメラ（浜松ホトニクス）、テレビ画像解析装置（ARGUS100、浜松ホトニクス）を組合せたものである。pHiと測定した蛍光比の較正は、nigericin-K法を用いた。

【結 果】

非刺激時のpHiは7.2-7.4の範囲に分布し、その平均値は 7.290 ± 0.009 であった。NH₄前負荷法により細胞内に酸を負荷すると、その汲み出しは外液のNaイオンに依存し、一部Liイオンでも置換され、またNa/H交換輸送阻害剤amilorideにより阻害されたため、顎下腺腺房細胞にはNa/H交換輸送が存在していることが証明された。次にACh 1 μM を投与するとpHiは初め一過性に軽度の低下を示し、ついで上昇して4分後には投与前にくらべて平均 0.103 ± 0.015 上昇した。あ

らかじめ無Na溶液を灌流するとpHiは不変ないし、低下した。この状態にAChを投与すると、pHiはさらに低下し、続いて標準液で灌流するとpHiは急速に上昇し刺激前よりも高い値を示した。amiloride投与下でのACh刺激の際も無Na溶液と同様の結果が得られた。以上より、AChによりNa/H交換輸送が活性化されることが証明された。この活性化は、PKC阻害剤staurosporineによる影響を受けなかった。ACh刺激時Caiは上昇するが、細胞内貯蔵Caの放出を阻害するとされるTMB-8を加えた無Ca溶液灌流下では、ACh刺激によるCaiの上昇は著明に抑制され、またpHiの上昇も完全に抑制された。Caイオノフォア、ionomycinを投与し、細胞内Caを上昇させるとpHiはゆっくりした上昇を示し、無Na溶液、amiloride投与時にはACh刺激と同様の変化を生ずる事より、Na/H交換輸送活性化が惹起されることが明らかとなった。この上昇は、PKC阻害剤により影響を受けなかった。細胞外への酸汲み出しを細胞外pH測定によって観察した結果、ionomycinは酸排泄を著しく促進した。PKC活性化薬剤OAG、TPAは単独10分間以内処理してもほとんどpHiを上昇しなかったが、TPA処理2時間では有意なpHi上昇が見られた。

【結 論】

ラット顎下腺腺房細胞には、Na/H交換輸送が存在し、ACh及びionomycin刺激により活性化された。ACh刺激は細胞内の酸産生速度を著明に増加させ、Na/H交換輸送が抑制された条件ではpHiを低下させた。ACh刺激によるNa/H交換輸送の活性化を媒介する因子としては細胞内Caの上昇が主要であると考えられた。PKC活性化によるNa/H交換輸送の活性化は短時間では認められなかったが、長時間処理は有意にpHiを上昇させた。今後、ACh刺激時の細胞容積減少とNa/H交換輸送活性の関係を検討する。ACh刺激時のCaiの上昇は細胞膜のイオンチャンネルを開口し、細胞内KCl濃度の減少、さらに水分の喪失をもたらして細胞容積を減少する。この容積減少が、Na/H交換輸送を活性化する可能性を否定しえない。

審査結果の要旨

酵素反応など多くの細胞機能は細胞内pHに依存性を有する。一方細胞は酸化的代謝過程によりHイオンを産出するので、Hイオンを緩衝あるいは細胞外に出して細胞内pHを恒常的に保持する調節機構が存在する。Na/H交換輸送は細胞内pH調節機構の中で特に重要である。本研究はラット顎下腺を用い分泌活動時の細胞内pH調節のメカニズムを解明する目的で行われたものである。

ラット顎下腺房細胞には、Na/H交換輸送が存在し、アセチルコリン及びionomycin刺激により活性化された。アセチルコリン刺激は細胞内の酸産生速度を著明に増加させ、Na/H交換輸送が抑制された条件では細胞内pHを低下させた。アセチルコリン刺激によるNa/H交換輸送の活性化を媒介する因子としては細胞内Caの上昇が主要であると考えられた。protein kinase C活性化によるNa/H交換輸送の活性化は短時間では認められなかったが、長時間処理は有意に細胞内pHを上昇させた。protein kinase Cは直接Na/H交換輸送を活性化しないが、CaによるNa/H交換輸送の活性化を増強する可能性が示唆された。

以上の研究は、顎下腺分泌活動時のNa/H交換輸送活性化のメカニズムに新しい知見を加えたものであり、学位論文に値するものと判断された。