



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Electrophysiological Study of Neurotransmission in Hamster Blood Vessels : Interaction between Sympathetic Perivascular Nerves and Endothelium( 内容の要旨 )
Author(s)	THAPALIYA, SHARADA
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第093号
Issue Date	2001-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/2147">http://hdl.handle.net/20.500.12099/2147</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本籍)	THAPALIYA SHARADA (ネパール王国)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	獣医博甲第93号
学位授与年月日	平成13年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Electrophysiological Study of Neurotransmission in Hamster Blood Vessels: Interaction between Sympathetic Perivascular Nerves and Endothelium
審査委員	主査 岐阜大学 教授 武 脇 義 副査 帯広畜産大学 教授 西 村 昌 数 副査 岩手大学 教授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一 副査 岐阜大学 教授 小 森 成 一

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

ほとんどの器官は交感神経性と副交感神経性成分による拮抗神経支配を受けているが、血管系は主に交感神経線維により支配されている。そして、血管緊張がこれらの神経と内皮細胞により調節されていることもよく知られている。ところが、交感神経と内皮細胞の相互作用に関しては未だ明らかにされていない。それ故、本研究ではこのような相互作用が交感神経性の血管周囲神経と内皮細胞の間に存在するかどうかを細胞内微小電極法を用いて、ハムスター腸間膜動脈における平滑筋細胞の膜電位変化を測定することにより調べた。

血管平滑筋細胞から興奮性接合部電位(EJPs)を記録することにより、機能的な神経支配の開始とその推移を明らかにするために実験を行った。2週齢の個体では、血管周囲神経刺激はEJPsを惹起しなかった。振幅の一定しないEJPsが3週齢の個体で初めて断続的に記録された。ところが、8週齢以上の個体においては、振幅の一定したEJPsがほとんどすべての標本で惹起され、このEJPsは刺激頻度の増加と共に促通効果を示した。

これらの EJPs は P2X 受容体拮抗薬である PPADS によって抑制され、これによりこの EJPs が P2X 受容体の活性化によるものであることがわかった。外因性の ATP でも脱分極は惹起されたが、この脱分極も PPADS により抑制された。これらの結果より、この EJPs を引き起こす神経伝達物質は ATP であることが示唆された。

内皮依存性過分極のメカニズムを説明するため、幾つかの実験を行った。内皮由来の過分極電流はギャップジャンクションを通して平滑筋に伝導されると推測されているが、ACh による内皮依存性過分極はギャップジャンクション遮断薬であるカルベノキソロンで影響を受けなかったことより、この仮説とは相反するものであった。この過分極は  $Ca^{2+}$  活性化型低コンダクタンス  $K^{+}$  チャンネル遮断薬であるアパミンと  $Ca^{2+}$  活性化型高コンダクタンス  $K^{+}$  チャンネル遮断薬であるカリブドトキシンの併用下では抑制されたことより、内皮から遊離した拡散性因子によることが示唆された。また、この過分極はシクロオキシゲナーゼの阻害薬であるインドメサシン、そして NO 合成酵素阻害薬である L-NAME の存在下では影響を受けることはなかった。外液の  $K^{+}$  濃度の上昇は過分極ではなく脱分極を惹起した。これらの結果から、この過分極はプロスタサイクリン、NO および  $K^{+}$  以外の内皮由来の因子 (EDFs) によることが示唆された。

神経から放出された ATP が内皮を刺激し EDFs を放出することができるかどうかを検索するため、PPADS を前処置した血管において実験を行った。一過性の過分極が 20Hz の刺激において細動脈 (100-150  $\mu\text{m}$ ) では惹起されたが、より太い動脈 (300-350  $\mu\text{m}$ ) では惹起されなかった。また、血管外膜から適用した ATP の反応は先の神経性の過分極に類似していた。神経刺激と ATP の双方により惹起された過分極は P2Y 受容体拮抗薬であるシバクロンブルー-F3GA により抑制され、内皮除去により消失した。それ故、これら細動脈では神経から放出された ATP が内皮細胞の P2Y 受容体を活性化し、EDFs を放出することにより一過性の過分極を引き起こしていることが示唆された。

EJPs の振幅が間接的に ATP の放出量を示している報告があることより、EDFs が神経調節効果を持っているか否かについて、EJPs の振幅を測定することにより実験を行った。P2Y<sub>2</sub> 受容体の特異的作動薬である UTP は、正常標本では EDFs に起因する過分極を引き起こした。EDFs が作用している間は、EJPs の振幅は約 50% まで抑制され、内皮を除去した標本においては EJPs の振幅は抑制されなかった。これらの結果より、EDFs がプリン作動性神経伝達における抑制性調節因子として神経終末からの ATP 放出を抑制することが示唆された。

結論として、交感神経性の血管周囲神経から放出された ATP が内皮細胞に到達し、プリン受容体を活性化することにより EDFs が放出されるものと思われる。また、この

EDFs がプリン作動性神経終末からの ATP 放出を抑制することも示唆された。本研究結果は、交感神経性の血管周囲神経と内皮細胞との間には血管緊張を調節する上で直接的な相互作用があることを示唆している。それ故、これらの相互作用は抵抗血管の局所血流調節において重要な役割を担っているものと考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

循環系の調節は、交感神経や内皮細胞が重要な役割を担っている。しかしながら、交感神経と内皮細胞の相互作用に関してはいまだ明らかにされていない。申請者は、交感神経性の血管周囲神経と内皮細胞の間に相互作用が存在するかどうかを、細胞内微小電極法を用いて、ハムスター腸間膜動脈における平滑筋細胞の膜電位変化を測定することにより調べた。

1) 平滑筋細胞から興奮性接合部電位(EJPs)を記録することにより、機能的な神経支配の開始とその推移を明らかにするために実験を行った。3週齢の個体で初めて機能的な神経支配が発現し、8週齢以上の個体で成熟する結果を得た。また、EJPsあるいは外因性の ATP による脱分極は、P2X 受容体拮抗薬によって抑制されたことから、血管周囲神経の主要な情報伝達物質は ATP であることを示唆した。

2) 内皮依存性過分極のメカニズムを説明するため、幾つかの実験を行った。内皮由来の過分極電流はギャップジャンクション遮断薬で影響を受けなかったが、Ca<sup>2+</sup>活性化型 K<sup>+</sup>チャネル遮断薬で抑制されたことより、内皮から遊離した拡散性因子によることが示された。また、この過分極はシクロオキシゲナーゼの阻害薬およびそして NO 合成酵素阻害薬では影響を受けることはなかった。外液の K<sup>+</sup>濃度の上昇は過分極ではなく脱分極を惹起した。これらの結果から、この過分極はプロスタサイクリン、NO および K<sup>+</sup>以外の内皮由来の因子(EDFs)によることを示唆した。

3) 神経から放出された ATP が内皮を刺激し、EDFs を放出することができるかどうかを明らかにするために実験を行った。一過性の過分極が 20Hz の刺激において細動脈(100-150 μm)では惹起されたが、より太い動脈(300-350 μm)では惹起されなかった。また、血管外膜から適用した ATP の反応は先の神経性の過分極に類似していた。神経刺激と ATP の双方により惹起された過分極は P2Y 受容体拮抗薬により抑制され、内皮除去により消失した。それ故、これら細動脈では、交感神経性の血管周囲神経終末から放出された ATP が内皮細胞の P2Y 受容体を活性化し、EDFs を放出することにより一

過性の過分極が引き起こされることを明らかにした。

4) EDFs が神経調節効果を持っているか否かについて、EJPs の振幅を測定することにより実験を行った。P2Y<sub>2</sub>受容体の特異的作動薬である UTP は、正常標本では EDFs に起因する過分極を引き起こした。EDFs が作用している間は、EJPs の振幅は約 50% まで抑制され、内皮を除去した標本においては EJPs の振幅は抑制されなかった。これらのことより、EDFs がプリン作動性神経伝達における抑制性調節因子として神経終末からの ATP 放出を抑制することを示した。

以上、本研究は、交感神経性の血管周囲神経と内皮細胞との間には血管緊張を調節する上で直接的な相互作用があることを初めて明らかにしたもので、循環系の局所調節機構を解明する研究の発展に寄与するものと判定される。これらの相互作用は抵抗血管における局所血流調節において重要な役割を担っているものと考えられる。

審査委員は、全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 学位論文の基礎となる学術論文

1. Thapaliya, S, Matsuyama, H and Takewaki, T. (1999). ATP released from perivascular nerves hyperpolarizes smooth muscle cells by releasing an endothelium-derived factor in hamster mesenteric arteries. *Journal of Physiology*. 521,191-199.
2. Thapaliya, S., Matsuyama, H. and Takewaki, T. (2000). Bradykinin causes endothelium-independent hyperpolarization and modulates neuromuscular transmission by prostanoid synthesis in hamster superior mesenteric artery. *European Journal of Pharmacology*, 408, 313-321.

#### 既発表学術論文

1. Matsuyama, H., Thapaliya, S. and Takewaki, T. (1999). Cyclic GMP-associated apamin-sensitive nitrergic slow inhibitory junction potential in the hamster ileum. *British Journal of Pharmacology*, 128, 830-836.

2. Saito, H., Thapaliya, S., Matsuyama, H., Nishimura, M. and Takewaki, T. (2001). Enhancement of ATP release in hindlimb sympathetic perivascular nerve of the golden hamster during hibernation. *Journal of Physiology*. 531, 495-507.