

学 位 論 文 Doctor's Thesis

論文題名 : ウシ毛様体筋細胞におけるカフェイン惹起カルシウム活性化カリウム電流
に対する、ノルアドレナリンの増強作用
(Noradrenaline receptor-mediated potentiation of caffeine-induced Ca^{2+} -activated
 K^{+} currents in bovine ciliary muscle cells)

著者名 : 奥田 聡哉
Toshiya Okuda

指導教官名 : 前眼科学担当教授
根木 昭
薬理学第二担当教授
西 勝英

審査委員名 : 知覚生理学担当教授 小川 尚

生理学第一担当教授 志賀 潔

細胞識別学担当教授 栗原 裕基

2002年度

目次

1. 要旨
2. 学位論文の骨格となる発表論文および過去の発表論文リスト
3. 謝辞
4. 略語一覧
5. 研究の背景と目的
 - I. 毛様体筋
 - a. 毛様体筋の構造、神経支配と作用
 - b. 眼科臨床における自律神経作動薬の使用
 - II. Ca^{2+} -activated K^{+} channel、特に BK channel の特性とその役割
 - III. 研究の目的
6. 実験方法
 - I. 実験標本と手法
 - a. ウシ毛様体筋細胞の新鮮単離
 - b. α -isoactin 免疫染色による平滑筋細胞の同定
 - c. 実験溶液と薬剤、およびその投与法
 - II. パッチクランプ法による膜電流記録
 - a. パッチクランプ法
 - b. パッチクランプ法の原理
 - c. パッチクランプ法の変法
 - d. パッチクランプ法の有用性
 - e. 膜電流記録

III. 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

a. Fura-2 loading

b. 細胞内 Ca^{2+} の Fura-2 ratiometry

7. 実験結果

I. ウシ毛様体筋細胞のカフェイン惹起 Ca^{2+} -activated K^{+} channel 電流 (ICAF)

II. ICAF に対するノルアドレナリンの作用

III. ノルアドレナリンで増強された ICAF の活性化動態と減衰動態

IV. ノルアドレナリンまたカフェインによる細胞内 Ca^{2+} の上昇

V. ICAF 増強におけるノルアドレナリン受容体の同定

8. 考察

9. 結語

10. 参考文献

1. 要旨

I. 目的

毛様体筋はその筋緊張が、調節や眼圧制御に関与する重要な平滑筋組織であり、临床上、その作用に影響を及ぼしうる多くの自律神経作動薬、例えば、眼圧下降や調節麻痺を目的とした副交感神経および交感神経の作動薬が使用されている。しかしながら、副交感神経作動薬に比較して、交感神経作動薬の作用機序に関しては不明な点が多い。また、毛様体筋の機能発現には、他の平滑筋細胞と同様に細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 動員が重要である。そこで、毛様体筋の細胞内 Ca^{2+} 動態に対するノルアドレナリン (NA) の影響について検討した。

II. 方法

コラゲナーゼ処理により得られた新鮮単離ウシ毛様体平滑筋細胞を用いて、ニスタチン穿孔パッチクランプによる膜電流測定と Fura-2 による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行った。単離平滑筋細胞にカフェイン (CAF) を急速投与 (< 数十ミリ秒) し、膜電位固定下に発生する CAF 惹起 Ca^{2+} -activated K^{+} 電流 (ICAF) と、細胞内 Ca^{2+} 濃度を指標とし、NA のウシ毛様体筋細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化と Ca^{2+} 依存性の膜電流に与える効果を観察した。

III. 結果

NA は濃度依存性に ICAF を増強した。NA の ICAF 増強効果は可逆的であるが、NA の除去後 ICAF の回復には 5~15 分を要した。増強前後の ICAF の活性化相と減衰相の動態には特に変化は認められなかった。CAF

による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は、NA により影響を受けなかった。 α_1 遮断薬（プラゾシン）の前処置により ICAF に対する NA の効果が完全に抑制された。 また、 α_2 作動薬（クロニジン）と β 作動薬（イソプロテレノール）は ICAF に全く影響を与えなかった。

IV. 考察

Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK channel) は、膜電位を過分極させ平滑筋の弛緩に寄与するとされているが、NA は α_1 受容体を介して、このチャンネル活性を濃度依存性に増強した。 NA により ICAF の動態や細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は全く影響を受けなかったことから、NA による ICAF 増強作用は、BK channel に対する直接作用であることが示唆された。 α_1 受容体を介した BK channel の活性増強は、交感神経作動薬などの眼圧下降作用において、毛様体の弛緩に寄与し、経ぶどう膜房水流出路 (uveoscleral outflow) からの房水流出を促進する可能性が示唆された。 また、毛様体筋は副交感神経と交感神経の二重支配が提唱されているが、NA は BK channel の活性の修飾により調節へ影響を及ぼしている可能性も示唆された。

4. 結論

NA は濃度依存性、可逆性に ICAF を増強した。 この作用は α_1 受容体を介しており、BK channel への直接作用であることが示唆された。

2. 学位論文の骨格となる発表論文および過去の発表論文リスト

Okuda T, Tokutomi N, Tokutomi Y, Murai Y, Negi A, Nishi K :
Noradrenaline receptor-mediated potentiation of caffeine-induced
 Ca^{2+} -activated K^{+} currents in bovine ciliary muscle cells. Curr Eye Res
23, 455-462, 2002.

Fujii T, Tokutomi N, Hirata A, Negi A, Nishi K : Cytoplasmic Ca^{2+}
mobilization and Ca^{2+} -dependent membrane currents in dispersed
bovine ciliary muscle cells. Curr Eye Res 16, 436-444, 1997.

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい研究環境を整えていただき、かつ終始あたたかく全般的に御指導下さいました熊本大学医学部薬理学第二講座・西勝英教授、神戸大学医学部眼科学講座・根木昭教授（元熊本大学医学部眼科学講座教授）に深く感謝いたします。

また生命科学に対する姿勢から基本的な技術まで全ての面で、常に情熱的にご指導いただきました熊本大学医学部薬理学第二講座・徳富直史助教授に心から感謝いたします。

日夜ご協力いただき、共同研究者としてお力添えいただいた熊本大学医学部薬理学第二講座・徳富芳子先生、北海道大学歯学部口腔生理学講座（元熊本大学医学部薬理学第二講座）・村井恵良先生に心から感謝いたします。

実験標本であるウシ毛様体筋を得るために、牛眼の提供を頂いた熊本市食肉センターの職員の方々に感謝いたします。

本研究は多くの動物の尊い生命の犠牲の賜物であることをここに銘記いたします。

平成14年 9月 30日

奥田聡哉

4. 略語一覧

ciliary muscle : CM

Ca^{2+} -activated K^{+} channel : K_{Ca} channel

large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel : BK channel

caffeine : CAF

intracellular Ca^{2+} concentration : $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Ca^{2+} -activated K^{+} channel current evoked by caffeine : ICAF

noradrenaline : NA

chalbachol : CCh

tetraethylammonium : TEA

charybdotoxin : ChTX

5. 研究の目的と背景

I. 毛様体筋 (CM)

CM は、間葉に由来し、内眼に存在する平滑筋であり、その筋緊張は調節のみならず房水流出抵抗の変調、すなわち眼圧の制御にも重要な役割を果たしているといわれている。しかしながら CM の有するこれら異なる二つの機能のメカニズムと、細胞生理学的意義については不明の点が多い。また、どのように、その異なる二つの機能が統合されているかは充分には解明されていない。その他、CM 機能の変調と老視のメカニズムの関係も依然不明な点が残されている。CM は、形態学的にも、免疫学的にも一般的な平滑筋の特徴を有していることが知られているが、この筋は他の平滑筋と比較して電気生理学的に特異な性質を有しており、その興奮の仕組みには、未だ研究の余地が多く残されている。

a. CM の構造、神経支配と作用

CM は、主に縦走線維 (Brucke 筋)、輪状線維 (Muller 筋) と斜走線維の三つの部分から構成されていることが知られているが、これらの部分は厳密に分かれているわけではない。最外層の縦走線維は、毛様体を強膜岬の部分で輪部に付着させており、この筋は後方へ走行し、赤道部付近で suprachoroidal lamina (脈絡膜と強膜を接合させる線維) に侵入する。最内層の輪状線維は、毛様体の前～内側部を占め、輪部と平行に走行する。斜走線維は縦走線維と輪状線維を連絡している。これらの筋が起始部を支点として収縮・弛緩を行う。

組織学的には、多数の筋細胞が集まって形成された筋細胞束（筋線維束）からなり、筋線維束の外周は線維芽細胞の突起で囲まれ、筋線維束間は結合織で充填される。

CM は交感神経系、副交感神経系の二重支配を受けている。CM の副交感神経系の支配神経の経路は、Edinger-Westphal 核を出て動眼神経の中を走り、毛様体神経節でニューロンを変え節後線維として短毛様体神経となり、この一部が虹彩、大部分（約 90%）は CM に分布する。交感神経系は、頸部交感神経に由来し、上頸部交感神経節にてニューロンを変え節後線維となる。節後線維はさらに上行し、頭蓋内へ入り、内頸動脈周囲神経叢を経て三叉神経第 1 枝（眼神経）を経由し長毛様神経となって眼球に入る。

CM の神経支配に関しては、従来、コリン作動性神経単独支配の概念があったが、現在では、NA 由来のカテコラミンの自発蛍光を発するアドレナリン作動性神経、無顆粒性シナプス小胞を含むシナプス膨大部を有する無髄神経線維の組織学的証明、および薬理学的、生理学的実験によって、二重支配が明らかにされ、広く認められている^{1, 2)}。また、近年では発現している mRNA の解析によって、ヒトの CM では、交感神経系では β_2 、副交感神経系では M_2 、 M_3 、 M_5 （主に M_3 ）が発現しているとされている³⁾。

CM の作用である調節においては、縦走筋の起始部である強膜岬を支点として、三種の筋線維が共同して収縮し、毛様体が前内方へ移動するために、チン小帯の緊張が減弱し、水晶体が自身の弾性によって厚みを増すことで屈折力が増加する。逆に、これらの筋の弛緩により水晶体が扁平化することで屈折力が低下する。副交感神経系刺激で CM の収縮（近方への調節）、交感神経系刺激で CM の弛緩を生じるとされているが、調節系における交感神経系の働きは非常に複雑であり、調節の薬理に関しては未だ一定の見解を得ず、不明

な点も多い 4, 5, 6, 7, 8, 9)。(表 1)

	agonist		antagonist
α	調節幅の減少 調節安静位の遠視化	調節幅減少 調節安静位のわずかな近視化	調節幅の増加 調節近点の近方偏移
β	調節近点の遠方偏移	調節安静位の遠視化	調節安静位の近視化

表 1 交感神経作動薬が調節へ及ぼす影響

上記のような作用が報告されているが、同様の交感神経作動薬を用いたにも関わらず、調節安静位、調節幅などに影響がないとする報告もある。

眼圧は、毛様体上皮細胞（無色素上皮細胞）で産生される房水量と、流出経路から眼外へ流れる房水量のバランスにより決定され、比較的狭い範囲内（10～20mmHg）に保たれている。

房水産生制御のメカニズムは未だ十分には判明していないが、毛様体には多種の神経伝達物質、神経伝達修飾物質を含む自律神経が分布し、また毛様体上皮細胞にはアドレナリン受容体（ α_1 、 α_2 、 β_2 ）、アセチルコリン受容体、アンギオテンシン受容体が存在することが知られており、このような神経作動性物質によって房水産生調節が行われていると考えられている。房水流出系にも自律神経終末が分布するが、房水流出の神経伝達物質を介した機能調節については、房水産生よりもさらに不明な点が多い¹⁰⁾。(表 2)

	receptor	眼圧	房水動態	作用部位と機序
agonist	α_1	↓	房水産生↓？ uveoscleral outflow↑？	毛様体突起の血管収縮
	α_2	↓ ↓	房水産生↓ uveoscleral outflow↑	交感神経シナプス前抑制 / 毛様体上皮のAC抑制 毛様体の細胞外マトリックス
	β_1	↓	線維柱帯流出↑ uveoscleral outflow↑ 房水産生↑（もしくは↓）	線維柱帯細胞の β 受容体 毛様体筋の β 受容体 毛様体上皮細胞の β 受容体
antagonist	α_1	↓	房水産生↓？ uveoscleral outflow↑？	？ ？
	α_2	↓	？	静脈拡張？
	β_2	↓	房水産生↓	毛様体上皮細胞の β 受容体

表 2 交感神経作動薬が眼圧、房水動態に及ぼす影響とその作用部位、機序。

房水の流出経路には、Schlemm 管を介するいわゆる conventional outflow（隅角線維柱帯→Schlemm 管→上強膜静脈）と Schlemm 管を介さない unconventional outflow：uveoscleral outflow（虹彩根部→毛様体および脈絡膜組織→強膜）がある。

房水流出抵抗の変調に関しては、conventional outflow である経 Schlemm 管の房水流出、unconventional outflow である uveoscleral outflow の流出抵抗の変調に、CM の収縮また弛緩が関与するとされている。

conventional outflow においては、CM の収縮により強膜岬が後方へ牽引され、隅角線維柱帯の小孔が開大することで房水流出が改善し、逆に CM の弛緩により房水流出が減少するとされている。

正常眼において、uveoscleral outflow の全房水流出量に占める割合は、ウサギで数%、サルで約 50%、ヒトでは 10~20%を占める（若年者では大で、加齢とともに減少するとされる）とされ、CM の収縮によって流出量が減少し、弛緩によって増加するとされている¹¹⁾。

conventional outflow と uveoscleral outflow に対する、CM の筋緊張が与える影響は、双方において相反しているが、いずれにせよ調節、また房水流出において CM が大きな影響を与えていることには異論がない。

b. 眼科臨床における自律神経作動薬の使用

眼科の臨床においては、散瞳薬、調節麻痺薬としてトロピカミド、フェニレフリン、アトロピン、シクロペントレート、眼圧下降薬として、副交感神経作動薬（ピロカルピン、カルバコール）、交感神経作動薬（エピネフリン、ジビベフリン）、交感神経遮断薬（ $\beta_1, 2$ 非選択性：チモロール、カルテオロール、ベフノロール、 β_1 選択性：ベタキシソロール）などが使用されており（図 1）、最近ではさらに α_1 遮断薬（ブナゾシン）、 α_2 作動薬（アブラクロニジン）が加わっている。さらに、自律神経作動薬ではないが、腸管膜動脈¹²⁾、気管支¹³⁾、子宮¹⁴⁾などの他の平滑筋組織に対しては収縮効果を生じる PG F₂ α が、CM に対しては対照的に弛緩効果を有し、uveoscleral outflow の促進物質として作用するため、代謝型プロスタグランジン製剤として実際に眼圧下降薬として使用されている^{15, 16)}。

虹彩
散瞳薬
アトロピン
トロピカミド
シクロペントレート
α -作動薬
フェニレフリン
縮瞳薬
コリン作動薬

毛様体筋
毛様体筋麻痺薬
アトロピン
トロピカミド
シクロペントレート
収縮薬
コリン作動薬
抗ChE阻害薬

毛様体
β -遮断薬
アドレナリン

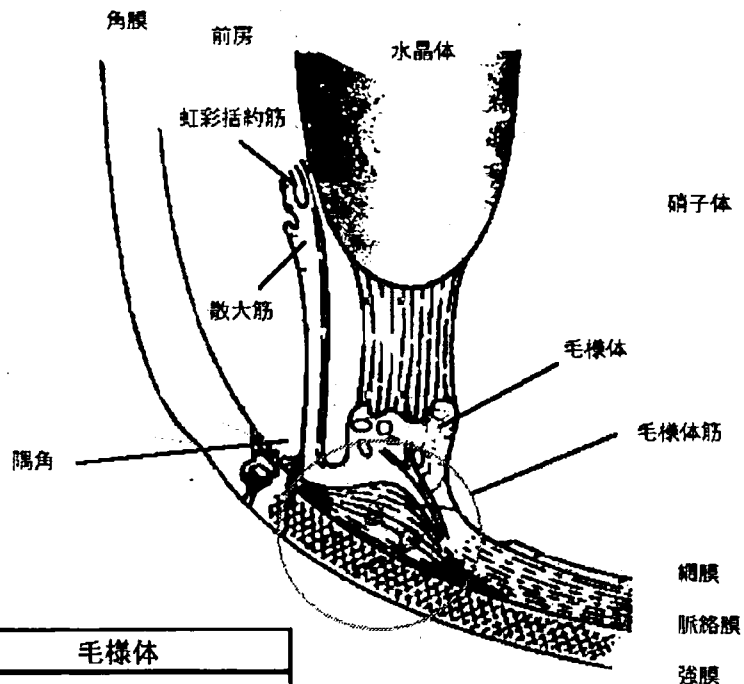


図1 眼科臨床で使用される自律神経作動薬と、その目的作用部位

上記のように、検査目的または治療目的で様々な自律神経作動薬などが使用されており、CM への直接の作用を目的とする使用ではなくとも、CM の筋緊張に対して何らかの影響が及んでいると考えられる。

アドレナリンや、そのプロドラッグとして臨床上用いられるジビベフリンなどのアドレナリン作動性物質も、眼圧下降の目的で使用されている。 アドレナリンは、血管平滑筋では α_1 受容体刺激によって inositol-1,4,5-trisphosphate (InsP₃)を介する細胞内 Ca^{2+} 放出により収縮を生じるが^{17, 18, 19}、気管支平滑筋では β_2 受容体刺激によって adenylyl cyclase が活性化され^{20, 21}、増加した cAMP による cAMP 依存性のメカニズムを介した弛緩を生じる²³。しかし、眼局所における使用での眼圧下降機序は房水産生の減少と流出の促進

とされているが、流出促進のメカニズムの詳細については未だ不明の点が多い。

II. Ca^{2+} -activated K^+ channel、特に BK channel の特性とその役割

K^+ channel は、神経細胞、心筋細胞、骨格筋細胞、平滑筋細胞、腎尿細管細胞、ランゲルハンス島 β 細胞、肝細胞、リンパ球など、興奮性また非興奮性細胞を問わず広く分布することが知られている。

K^+ channel の分類は、channel gating（開閉）機構から行うのが一般的であり、以下のように分類されている。膜電位の変化を感知して開閉が行われる電位依存性 K^+ channel (voltage-gated K^+ channel)、細胞内外より特異なりガンド（神経伝達物質、ホルモン、細胞内物質、イオンなど）が受容体に結合することで開閉するリガンド感受性 K^+ channel (ligand-gated K^+ channel)、膜の伸展などによって開閉する機械刺激受容 K^+ channel (mechano-sensitive K^+ channel) である。

細胞内 Ca^{2+} の増加によって活性化する Ca^{2+} -activated K^+ (KCa) channel は、ligand-gated K^+ channel に分類される。さらに、それらが開口した時のイオンのコンダクタンス、すなわち抵抗値の逆数より、large conductance、intermediate conductance、small conductance KCa channel の三つのサブタイプに分類される。

small conductance KCa channel (SK channel) は、6~14pS の小さなコンダクタンスを有する K^+ channel であり、後述の large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel より低濃度の Ca^{2+} に反応し開口するが、電位依存性はない。アパミンによって遮断され、キニン、ツボクラリンによって抑制されるが、テトラエチルアンモニウム (TEA) では抑制されない。神経、骨格筋細胞に存在し、活動電位発生後の後過分極 (slow afterhyperpolarization : AHP) に関与し、活動電位の発火頻度を調節する。

intermediate conductance K_{Ca} channel (IK channel) は、中等度の大きさのコンダクタンス (18~60pS) を有し、 10^{-8} ~ 10^{-6} M の Ca^{2+} 濃度に反応する。電位依存性、pH 感受性があり、ChTx、キニンで抑制される。

large conductance K_{Ca} channel (BK channel) は、平滑筋細胞、神経細胞、骨格筋細胞系に存在し、100~250pS と非常に大きなコンダクタンスを有し、細胞内側の Ca^{2+} が 10^{-7} ~ 10^{-5} M の濃度で変化すると活性化する。電位依存性があり、脱分極側でより開口しやすい。ChTx によって遮断され、TEA、 Ba^{2+} 、キニン、ツボクラリンによって抑制される。

BK channel は、 α と β サブユニットから構成され、 β 遺伝子の発現を抑制すると BK channel の Ca^{2+} 感受性が低下する。 β サブユニットがチャンネルの Ca^{2+} と膜電位感受性を増加させ、 Ca^{2+} シグナルを生理学的な機能へ変換する重要な分子であることが知られている。この活性増強は、コンダクタンスの変化ではなく開口確率 (open probability) の増加によるとされている^{24, 25)}。

BK channel は、平滑筋では、前述の細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位上の Ca^{2+} 放出チャンネルであるリアノジン受容体からの細胞膜直下 Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} spark) によって活性化され、一過性外向き電流 (spontaneous transient outward current : STOC) を発生することが知られている。BK channel は血管平滑筋において良く研究されているが、様々な受容体作動薬により Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} 放出が起こり、 Ca^{2+} spark の頻度増加を介して、BK channel が活性化される。この時、膜電位は過分極側へ傾き、血管内圧誘発性の脱分極に拮抗し、細胞外からの Ca^{2+} 流入経路である電位依存性の Ca^{2+} channel の活性化を抑制し、細胞内の Ca^{2+} 減少、ひいては血管弛緩を来すとされている²⁶⁾。

III. 研究の目的

藤井らは、ウシ CM 細胞がジヒドロピリジン (DHP) 抵抗性の voltage-gated Ca^{2+} channel、CAF 惹起の細胞内 Ca^{2+} 放出に反応する IK channel、および BK channel を発現していることを見出し、報告している²⁷⁾。

CM 細胞では、他の様々な平滑筋細胞種において認められるものと類似した CAF 惹起の Ca^{2+} -activated K^{+} 電流 (ICAF) と、その誘因となる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は、CAF 頻回投与により繰り返し確認されたが、ムスカリン作動性コリン受容体作動薬である CCh によって惹起される類似反応は、繰り返し投与では確認されなかった。電流と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 増加の反応は、ラットの内臓平滑筋細胞²⁸⁾やモルモットの血管平滑筋²⁹⁾で認められているように”all or none”の様式で生じていると考えられた。それゆえに、ICAF は CM 標本に生理機能を引き起こす細胞内 Ca^{2+} 動員を反映する良い指標であると考えられた。

CM の自律神経による神経支配、自律神経系受容体の存在により、临床上使用される前述の薬剤が CM の細胞内 Ca^{2+} 動態、引いては機能発現に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。しかし、アドレナリン作動薬が CM 細胞の細胞内 Ca^{2+} 動員、さらにその結果生じる Ca^{2+} 依存性機能へ与える影響はほとんど知られていない。

本研究では、自律神経作動薬が単離 CM 細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や Ca^{2+} 依存性のメカニズムに与える効果を検討するために、単離 CM 細胞の CAF に対する反応を指標として NA が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ や Ca^{2+} 依存性の膜電流に与える効果をパッチクランプにより観察し、また Fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 測光によって細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を観察することで、NA の作用の薬理学的また生理学的機序を確定した。

6. 実験方法

I. 実験標本と手法

a. ウシ CM 細胞の新鮮単離

ウシ眼球からの CM 細胞の新鮮単離は、屠殺場にて屠殺後 30 分以内の新鮮ウシ眼球を入手し、前回の報告の方法²⁷⁾を若干修正して行った。

ウシ眼球から CM は以下のようにして得た。 強角膜輪部の 8mm 後方で円周状に切り出し、角膜、水晶体、虹彩を除去した。 毛様突起と毛様体上皮を除去し、強膜に付着した毛様体実質を完全に分離した。 0.3%コラゲナーゼ (Sigma USA)、0.2%パパイン (Wako, Japan) を含む 2ml の Ca^{2+} free external solution (ES) を 50ml コニカルチューブへ入れ、ウォーターバス (Personal-10、TAITEC、Japan) で振盪しながら、毛様体実質を 35°C で 1 時間インキュベーション施行した。 その後、実質を含む溶液をパスツールピペットでピペッティングし粉砕し、30ml の Ca^{2+} free ES へ入れた。 1000rpm で 5 分間、遠心分離した。 2ml の ES を含むカルチャーディッシュ (Melidian、USA) 中に、得られた細胞を 250 μl ずつ分注した。 細胞はディッシュ中央の poly-L-lysine を塗布したカバースリップ上へ散布した。 ディッシュを静置すると、細胞はカバースリップに強固に接着し、一時間以内にパッチクランプ法や $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の Fura-2 ratiometry の実験に使用可能となった。 新鮮単離して得られた細胞は同日中、実験に使用した。

b. α -isoactin 免疫染色による平滑筋細胞の同定

この研究で使用する細胞が平滑筋細胞であることを確認するために、平滑筋特異的 α -isoactin に対するモノクローナル抗体 (一次抗体) と、フルオレセイ

ニイソチオシアネート (FITC) 標識モノクローナル抗体 (二次抗体) と平滑筋のマーカーを用いて、細胞の同定を行った³⁰⁾。

我々の分離方法で得られた単一の CM 細胞をカバースリップに散布し、4% パラフォルムアルデヒド (PFA) で 5 分間固定した。PFA を PBS で 3 回洗浄し除去した後、細胞を PBS で 300 倍希釈した平滑筋特異的 α -isoactin に対するマウスモノクローナル抗体 (Progen Biotechnik, Germany) と共に 60 分間室温でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、5% のウシ血清アルブミンを含む PBS で 60 倍希釈した FITC 結合ウサギ抗マウス IgG (WAKO, Japan) と共に、細胞を更に 30 分間インキュベートした。

未反応の抗体を PBS で洗浄除去した後、細胞を蛍光顕微鏡 (BX50、OLYMPUS, Japan) で鏡検、写真撮影した。抗体結合の特異性は、一次抗体の代わりに PBS または非免疫マウス血清で処理したコントロールのサンプルと比較することで調べた。

c. 実験溶液と薬剤、およびその投与法

標準外液 (ES) のイオン組成は、NaCl 150mM、KCl 5mM、MgCl₂ 1mM、CaCl₂ 2mM、HEPES 10mM、Glucose 10mM、pH は 1N の NaOH で 7.4 に調整した。パッチピペット内液のイオン組成は、KCl 150mM、HEPES 10mM、pH は 1N の KOH で 7.2 に調整した。実験に使用した薬剤はニスタチン (Nakarai Chemical, Japan)、Fura-2/AM (Dojindo, Japan)、ノルアドレナリン (Sigma, USA)、イソプロテレノール (Sigma, USA)、カフェイン (Sigma, USA)、プラゾシン (Sigma, USA) である。

マルチバレルピペット法を用いて薬液の迅速な投与を行った³¹⁾。通常、灌流ピペットは、一定で迅速な灌流 (<10ms) が可能で機械的な障害を細胞

に与えないように細胞から 50～100 μm 離れた位置に設置した。アーチファクトを除去するために試験溶液を灌流する前には細胞は細胞外液で持続灌流した。

II. パッチクランプ法による膜電流記録

a. パッチクランプ法

パッチクランプ法は、細胞膜において単一あるいは複数のイオンチャネルの分子の活動を、それを通過するイオン電流として直接記録する方法で、1976 年に Neher と Sakmann によって開発された。その後、いくつかの変法の追加開発によって、1980 年以降多くの細胞系に適用されるようになった。

b. パッチクランプ法の原理

細胞膜にガラス管微小電極（パッチ電極）の先端を押し当て、電極内に陰圧をかけると、電極先端のガラスと細胞膜との間にギガオーム ($\text{G}\Omega$ 、 $10^9\Omega$) 以上の高抵抗の密着（ギガシール）が得られる。このギガシールにより、電極先端開口部の微小膜領域（パッチ膜）を電氣的に他の領域と隔絶した状態で電位固定し、電流ノイズを減少することにより、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流 (pA 、 10^{-12}A オーダー) を計測する方法がパッチクランプ法である。(図 2)

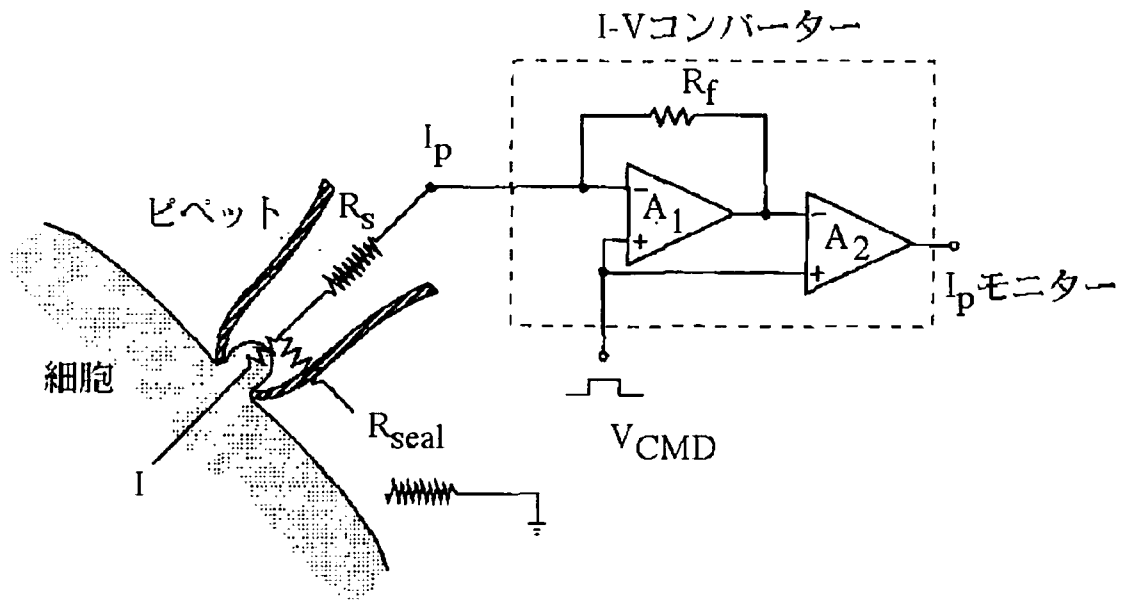


図2 patch clamp 法の原理図

R_s はパッチ膜抵抗に入るシリーズ抵抗（またはアクセス抵抗）、 R_{seal} はシール抵抗である。 R_s は通常 $1 \sim 5 \text{ M}\Omega$ で、 R_{seal} が $10 \text{ G}\Omega$ 以上になれば、 $I_p / I = R_{seal} / (R_s + R_{seal}) \sim 1$ となる。 この I_p を I-V コンバーター（点線）内の高抵抗フィードバックレジスタ（ R_f ）における電圧下降として検出する。

c. パッチクランプ法の変法

パッチクランプ法には種々の変法があるが、大きくは単一チャンネル電流記録と全細胞電流記録に分けられる。

単一チャンネル電流記録法 (single channel recording) としては cell attach mode が初めに開発され、その後に inside-out mode および outside-out mode が開発された。 さらに最近、open cell-attached inside-out mode と perforated vesicle outside-out mode が開発された。 全細胞電流記録法

(whole-cell recording)には conventional なものに perforated patch mode が加わった。

whole-cell 法はギガシールを形成した後にパッチ膜を破って穴を開け、パッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を記録するものであるが、perforated patch mode は、その whole-cell 法の変法で、コレステロールを含んだ細胞膜に一価イオンのみを通す小孔を形成することが出来るイオノフォア（ニスタチン、もしくはアムホテリシン B）をパッチ電極から与え、パッチ膜に多数の導電性小孔を作成し、それを介して全細胞電流を記録するものである。

conventional whole-cell mode では形成した穴を通して細胞内をパッチ電極内液で透析することになり、細胞内二次伝達物質を含む可動小分子がパッチ内液へと漏出する (washout) という欠点がある。一方、perforated patch mode では前述のパッチ膜に形成した多数の導電性小孔を介して全細胞電流の計測を行うため、この方法では細胞内成分の漏出が無く、細胞内情報伝達系を温存した状態での記録を行うことが可能となる。(図3)

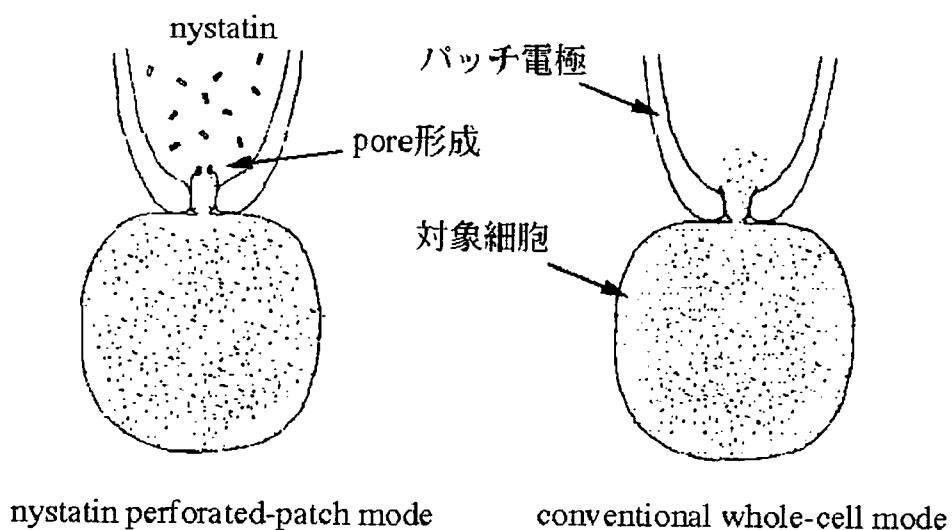


図3 パッチクランプ法の変法（全細胞電流記録法）

左：パッチピペット内のニスタチンによって形成された小孔を介して電流記録を行う。細胞内の細胞内二次伝達物質を含む情報伝達系を温存したまま記録が可能となる。右：パッチ膜を破り細胞に穴を開け、パッチ膜以外の全細胞電流を記録する。この穴を介して細胞内をパッチ電極内液で透析可能なため、細胞内環境をコントロールすることができる反面、細胞内の細胞内二次伝達物質を含む可動小分子がパッチ内液へと漏出する (washout) という欠点がある。

d. パッチクランプ法の有用性

細胞膜には極めて多数の蛋白質が貫通しており、それらはチャンネルやトランスポーターや受容体として働き、外界との間で物質や情報のやり取りをしている。パッチクランプ法は、細胞膜に存在する単一または細胞膜全体のチャンネルの開閉を電流という形で観察可能にする画期的な方法であり、細胞活動や機能の解明には、これらチャンネルなどの膜蛋白の活動メカニズムの解明と統合的理解には不可欠な方法である。

e. 膜電流記録

whole-cell 記録は、ニスタチン穿孔パッチクランプ法^{32, 33)}を用いて室温下 (22~25 °C) で行い、パッチクランプアンプ (CEZ 2300、Nihon-Kohden、Japan) による膜電位固定下で記録した。データは 3KHz でローパスフィルター処理し、同時にペン記録器で記録、記録用に改良を加えたデジタルオーディオカセットレコーダー (DTC-59ES、SONY、Japan) に、解析のために保存した。

記録用のパッチピペット (外径 1.5mm の Pyrex glass tube、Narishige、

Japan) はニスタチンを 0.1~0.3mg/ml 含んだピペット溶液で内部を満たした。ES 中でのこのピペットの抵抗は 2~3M Ω とシリーズ抵抗は 5~8M Ω で補償は行わなかった。

細胞内 K⁺ 濃度の平衡が 5~6 分で得られるため、ニスタチン穿孔パッチが形成された 10 分後より電流計測を始め、CAF 惹起電流の逆転電位を調べた。ウシ CM 細胞の膜容量は、26.8 \pm 2.8pF (n=6)であった。

III. 細胞内 Ca²⁺ 濃度測定

a. Fura-2 loading

poly-L-lysine でコートしたカバーガラスを中央に固定した 35mm プラスチックディッシュ上の単一 CM 細胞を 5 μ M の Fura-2 (Fura-2/AM) のアセトキシメチルエステルを含む normal ES 中で 20 分間、30 ° C の暗室でインキュベートした。Fura-2/AM 添加の後に、細胞外に残存した色素を完全に除去するために CM 細胞を normal ES で洗浄し、30 分間室温に放置した。

b. 細胞内 Ca²⁺ の Fura-2 ratiometry

Fura-2 で染色した CM 細胞をキセノンランプの 340、380nm の励起光で観察した。蛍光顕微鏡 (Nikon、DIAOPHOTO-TMD、Tokyo、Japan) で観察した CM 細胞の蛍光像は 510nm バンドパスフィルターと SIT カメラ (HAMAMATHU、C 2400、Hamamathu、Japan) を通してイメージプロセッサ (HAMAMATHU、ARGUS-50、Hamamathu、Japan) へ取り込んだ。340nm と 380nm での蛍光輝度の比率をモニターし、解析ソフトウェアを用いて [Ca²⁺]_i の変化を評価するためにコンピューター (HAMAMATHU、U 4469、Hamamathu、Japan) 処理した。

[Ca²⁺]_i 計測の際の薬剤投与は、膜電流計測の際と同様にマルチバレルピペット法を使用した。 全ての計測は 22～25℃の室温下で行った。

7. 実験結果

I. ウシ CM 細胞の ICAF

前回の実験結果から、逆転電位、アパミン抵抗性および TEA と ChTx 感受性を基に、ウシ CM における ICAF は、IK もしくは BK 型 Ca^{2+} -activated K^+ 電流であることを報告している²⁷⁾。

図 4a に、膜電位固定下でのニスタチン穿孔パッチクランプ法を用いて、様々な保持電位での ICAF を示した。ICAF は -60mV 以上の保持電位において観察され、保持電位を脱分極側に変化させるに応じて増加した。(図 4a)

図 4b に、それぞれの保持電位に対する ICAF 最大振幅を保持電位に対してプロットしたものを示した。

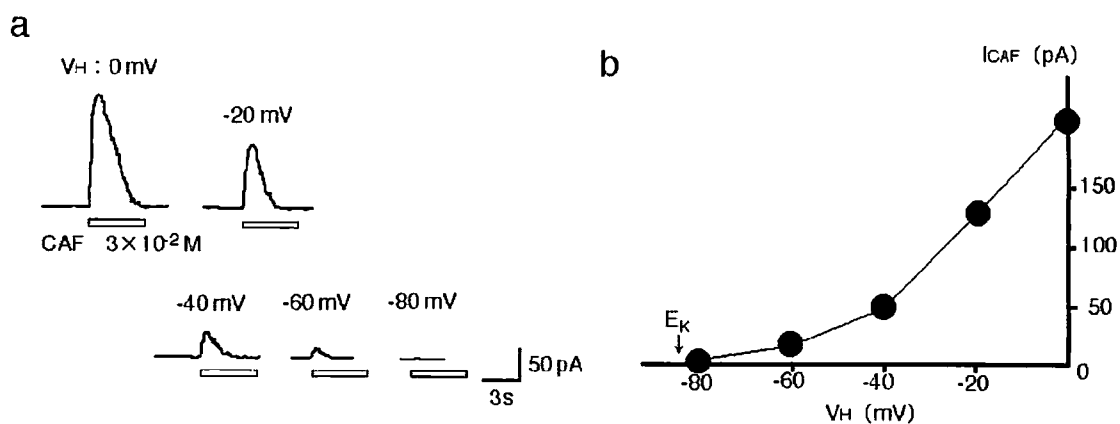


図 4 ICAF の電流電圧 (I-V) 関係。

a : 各保持電位における ICAF の電流波形記録。 白いバーは $3 \times 10^{-2} \text{M}$ の CAF 投与を示す。

b : ICAF の I-V 関係。 横軸が保持電位、縦軸が ICAF の振幅を示す。 E_K は K^+ の平衡電位を示す。

ICAF の I-V 関係は、外向き整流性を示しており、ウサギ腸管平滑筋³²⁾、ウシ CM 細胞²⁷⁾、ネズミ胃³⁴⁾ また膀胱平滑筋³⁵⁾ で観察された Ca^{2+} -activated K^{+} 電流と類似していた。図 4b に示したように、ICAF の I-V 関係から細胞内外の K^{+} 濃度がそれぞれ 5、150mM の条件下で Nernst の式により外挿すると、逆転電位が K^{+} の平衡電位に近似しており、その値は -85mV であった。このことは、前回の報告と同じく ICAF が K^{+} 電流であることを示している²⁷⁾。

採用した実験条件下では、検討した CM 細胞 (n=112) において、内向き電流は全く観察されなかった。

II. ICAF に対する NA の作用

以前の報告において、ウシ CM 細胞は CCh に対しても反応を示し、ICAF に類似の一過性外向き電流を生じたが、CCh に対する反応が観察されるのは一度のみで、ラット腸管平滑筋²⁸⁾ やモルモット血管平滑筋²⁹⁾ での CCh に対する反応と同じく” *all or none*” 様式の応答であることを示した²⁷⁾。

図 5a に 5 分間隔で惹起した ICAF に対する NA の効果を示した。CAF や CCh 投与が直接外向き電流を惹起するのとは対照的に、同一の膜電位固定条件下において検討した全ての細胞 (n=25) で、NA は全く電流応答を惹起しなかった。(図 5a) しかし、NA を 20 秒間前投与すると、NA は ICAF に対して著明な増強作用を示した。

ICAF に対する NA の効果は、同濃度の NA 投与でも二度目には減弱傾向を認めた。(データ非提示) それゆえに、ICAF に対する NA の効果の検討は、一個の CM 細胞において、一種類の濃度の NA を用いて、一度のみとした。

NA の除去後は増強された ICAF は徐々に減弱し、最終的にはコントロールレベルまで回復した。(図 5a) 図 5b に、NA (10^{-5}M) の ICAF 増強効果

を検討した CM 細胞の、ICAF のタイムコースを示した。 ICAF の増強率は個々の細胞によって様々であったが、増強状態からの回復過程のタイムコースは類似していた。 NA の除去後 30 分以内には検討した全ての CM 細胞 ($n=4$) において ICAF のコントロールレベルへの完全な回復が得られた。 NA による ICAF 増強の程度は NA の濃度に依存した。

図 5c に ICAF 増強効果の NA 濃度依存性を、 $3 \times 10^{-2} \text{M}$ の CAF で得られる ICAF を対照としてノーマライズした最大電流振幅と NA 濃度の関係曲線 (concentration-effect curve) で示した。 NA による ICAF 増強の concentration-effect curve は Lineweaver-Burk plot に基づき約 10^{-4}M の NA の時の効果を最大値と見なした。 half-maximal effect を生じる NA 濃度 (EC_{50}) は $1.2 \times 10^{-7} \text{M}$ であった。(図 5c 矢印)

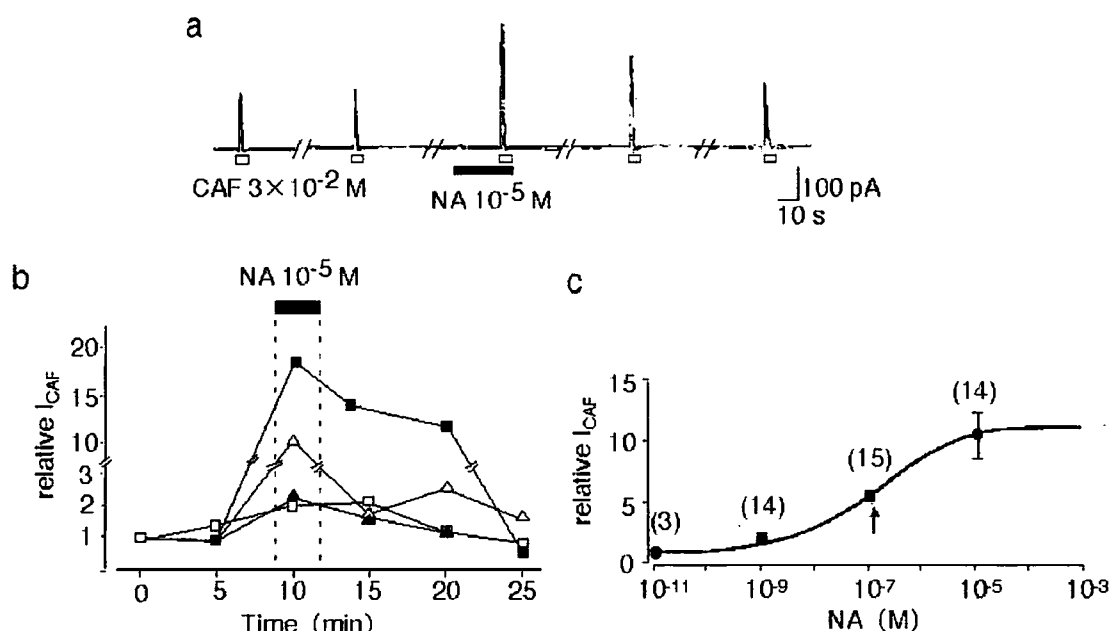


図 5 NA による ICAF の増強。

a : 5 分間隔で惹起した ICAF と NA の影響。 白と黒のバーはそれぞれ CAF と NA の投与を示す。

b : ICAF に対する NA の効果の時間経過。 横軸は時間経過、縦軸はコントロールの ICAF 電流振幅を 1 とした時の比を示す。

c : NA による ICAF 増強作用の concentration-effect relationship。シンボルとエラーバーは、増強を受けた ICAF をコントロールの ICAF でノーマライズした際の、mean relative ICAF と SEM \pm mean を示す。

NA 濃度が 10^{-11} M の場合のエラーバーはシンボル中に含まれている。横軸は NA 濃度、縦軸はコントロールの ICAF と比較した NA 投与による増強時の ICAF の増強率を示す。 () 内は検討した CM 細胞数を示す。 矢印は EC₅₀ を示す。

III. NA で増強された ICAF の活性化動態と減衰動態

ウシ CM 細胞の ICAF は TEA、および ChTx 感受性の IK または BK (large conductance) 型 K_{Ca} 電流であることが確認されている²⁷⁾ため、ICAF に対する NA の作用のメカニズムは、細胞内 Ca²⁺ 放出活性もしくは K_{Ca} channel 活性の修飾のいずれかを含んでいると考えられる。 ICAF の活性化動態、および減衰動態の解析が、NA の作用により ICAF 発生の過程がどのように修飾されているのか、作用機序の解明の一助となる。 図 6a にコントロールの ICAF と NA によって増強された ICAF を時間軸を拡大して示した。

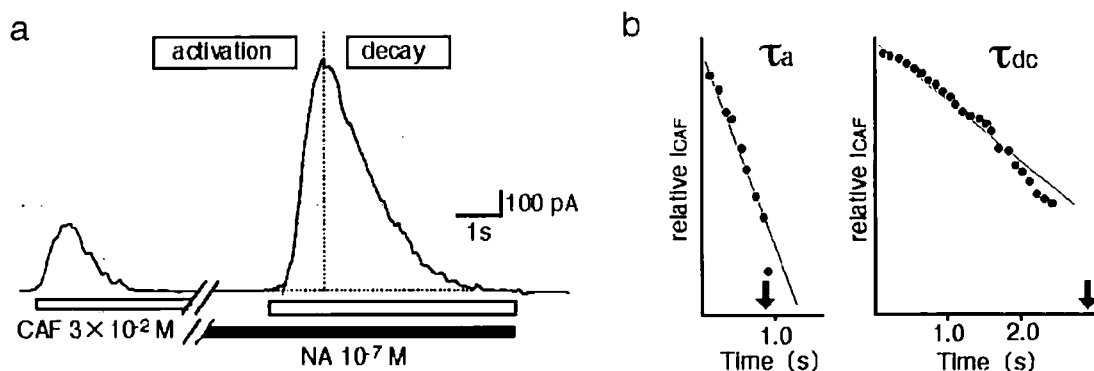


図 6 コントロールの ICAF と NA による増強を受けた ICAF の活性化動態と減衰動態

a : コントロールの ICAF と NA による増強を受けた ICAF の活性化動態と減衰動態。 白と黒のバーは、それぞれ CAF と NA 投与を示す。

b : NA 増強を受けた ICAF の活性化相（左）と減衰相（右）の single exponential fit。 矢印は活性化相と減衰相の時定数を示す。

水平点線で表した 0 電流ラインからの ICAF を、垂直点線で活性化相と減衰相に分けた。(図 6a) 図 6b に示すように、検討した全ての CM 細胞 ($n=15$) において、ICAF の活性化相と減衰相の動態は単一の指数関数に従った。 表 3 に、 $3 \times 10^{-2} \text{ M}$ の CAF 刺激での ICAF の τ_a (活性化相の時定数)、 τ_{dc} 値 (減衰相の時定数) と、 10^{-7} M の NA 投与により増強された状態の ICAF の τ_a 、 τ_{dc} 値を示した。 τ_a 、 τ_{dc} 共に NA による変化は特に認められなかった。

	I _{CAF}	I _{CAF} (NA)
Current (nA)	0.15±0.03 (n=15)	0.70±0.19 (n=15) *
τ_a (sec)	0.99±0.51 (n=15)	0.58±0.13 (n=15) n.s.
τ_{dc} (sec)	1.20±0.13 (n=15)	1.43±0.16 (n=15) n.s.

表3 コントロールの I_{CAF} と NA 増強を受けた I_{CAF} の活性化相と減衰相の時定数。

$3 \times 10^{-2} \text{M}$ の CAF により惹起されたコントロールの I_{CAF} と 10^{-7}M の NA によって増強を受けた I_{CAF} の τ_a と τ_{dc} 値。 *は I_{CAF} が統計的に有意な増強を受けていることを示す。(Student's paired *t*-test, $P > 0.05$) n.s.は τ_a と τ_{ds} に有意な変化がないことを示す。(Student's paired *t*-test, $P > 0.05$)

IV. NA また CAF による細胞内 Ca^{2+} の上昇

以前の報告において、ウシ CM 細胞における I_{CAF} の発生にはその機序としてリアノジン感受性細胞内 Ca^{2+} 放出が関与していることを明らかにした²⁷⁾。NA は、このリアノジン感受性細胞内 Ca^{2+} 放出を修飾しているのか、NA 単独で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を生じさせるのかを明確にすることが非常に重要である。

図 7a にウシ CM 細胞において CAF や NA の投与を行なった際の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の Fura-2 ratiometry の例を示した。

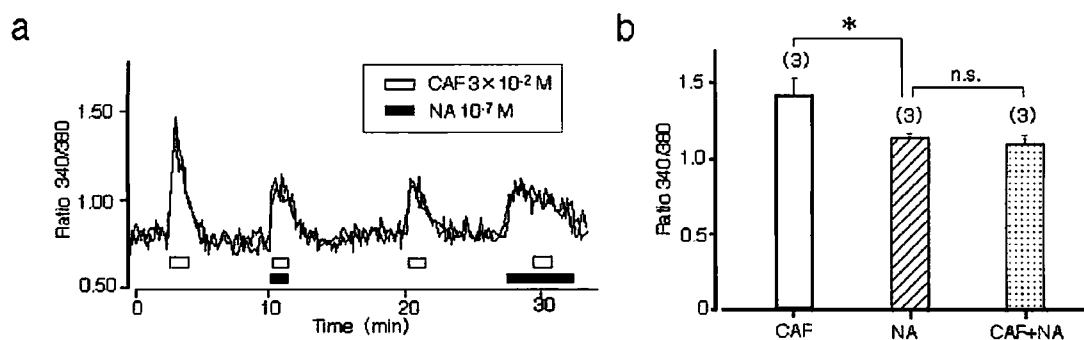


図7 CAF、NA 投与に対する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇。

a : $[Ca^{2+}]_i$ の Fura-2 ratiometry。 白と黒のバーは、それぞれ CAF と NA の投与を示す。

b : CAF (白いカラム)、NA (斜線のカラム)、CAF+ NA (点状のカラム) 投与に対する $[Ca^{2+}]_i$ のフルオレセイン蛍光の比。 ()

内は検討した CM 細胞の数を示す。 * は、比率間に統計的な有意差が存在することを示す。(Student's paired t -test, $P < 0.01$)

n.s. は、比率間に統計的な有意差がないことを示す。(Student's paired t -test, $P > 0.05$)

興味深いことに、膜電流計測実験においては、NA 単独投与では全ての CM 細胞で K_{Ca} 電流の発生を全く認めなかったが (図 5a)、NA 単独でも CAF 同様に一過性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を認めた。

これらの結果は、CAF 惹起性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇とは対照的に NA 惹起性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が K_{Ca} 電流の発生には関与していないことを示唆している。さらに、NA により ICAF が著明に増強されるにも関わらず、NA は CAF との同時投与を行っても CAF 惹起性の $[Ca^{2+}]_i$ の上昇に対しては殆ど影響を与えなかった。(図 7a、7b) このことは ICAF に対する NA の増強作用は、細胞質内の Ca^{2+} 放出部位ではなく、細胞膜上の BK channel に影響を及ぼした

結果であることを示唆している。

図 7b に CAF、NA、およびそれらの同時投与に対する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇値を示した。上記の状態下での Fura-2 ratiometry での $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、それぞれ 1.43 ± 0.06 (n=3)、 1.13 ± 0.01 (n=3)、 1.10 ± 0.04 (n=3) であった。CAF、NA による $[Ca^{2+}]_i$ の変化には統計的に有意差は認められなかった。(P < 0.01)

興味深いことに、CAF と NA の $[Ca^{2+}]_i$ に対する効果が互いに競合的であったことである。(図 7) NA 投与による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の間に CAF の追加投与を行っても、検討した全ての CM 細胞において (n=3) さらに $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認めなかった。(図 7b) このことは、両薬剤に対する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が、部分的には共通の Ca^{2+} 貯蔵部位に由来している、もしくは Ca^{2+} 貯蔵部位は全く異なっているが、両薬剤によって活性化される Ca^{2+} 放出経路がお互いに抑制を掛けていることが示唆される。

V. ICAF 増強における NA 受容体の同定

房水産生は β_1 アドレナリン作動性受容体遮断薬によって抑制されることが知られている³⁶⁾が、アドレナリンによる uveoscleral outflow の流出率改善のメカニズムに關与する受容体サブタイプに関してはほとんど知られていない³⁷⁾。

本研究での、CM 細胞の NA による ICAF 増強に關与する受容体サブタイプ同定は、交感神経作動薬の uveoscleral outflow の流出率改善に關与する受容体を決定する鍵となりうる。

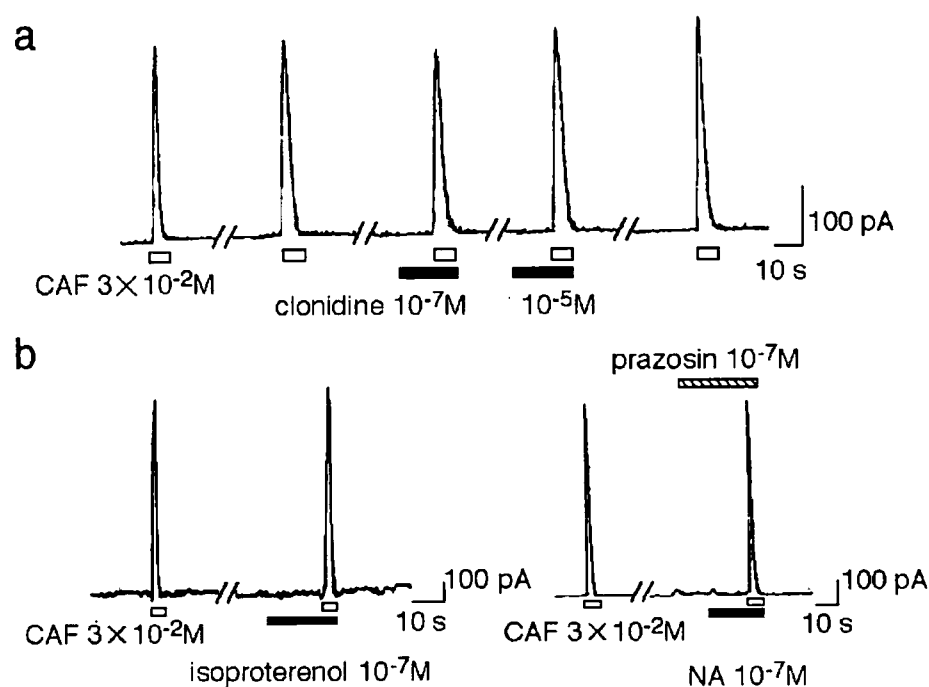


図8 ICAF に対する NA 作用を媒介する受容体の同定。

a : α_2 受容体作動薬であるクロニジンの ICAF に対する効果。

b (左) : β 受容体作動薬であるイソプロテレノールの ICAF に対する効果。

b (右) : α_1 受容体阻害剤であるプラゾシン存在下での、ICAF に対する NA の効果。 白いバーは CAF、黒いバーは各々クロニジン、イソプロテレノール、NA、斜線のバーはプラゾシンの投与を示す。

図 8a に α_2 受容体作動薬であるクロニジンの ICAF に対する効果を示した。検討した全ての CM 細胞において ($n=4$)、クロニジン投与では膜電流発生、および ICAF に対する増強作用も認めなかった。 β 受容体作動薬であるイソプロテレノール投与でも、検討した全ての CM 細胞において ($n=4$) 膜電流発生、および ICAF に対する増強作用も認めなかった。(図 8b 左) 図 8b 右に、 α_1 受容体遮断薬であるプラゾシンが NA による ICAF 増強効果に与える影

響を示した。 10^{-7}M のプラゾシンの前投与を行った全ての CM 細胞 ($n=6$) において、NA による ICAF の増強は完全に阻害された。

クロニジン、イソプロテレノール、プラゾシン存在下の NA の条件下での相対的な ICAF は、それぞれ 0.86 ± 0.12 ($n=4$)、 1.04 ± 0.06 ($n=4$)、 0.61 ± 0.16 ($n=4$) であった。 コントロールの ICAF と上記 3 つの条件下での ICAF には統計的に有意差は認められなかった。 ($P > 0.05$)

これらの結果は、NA による ICAF の増強が、 α_1 受容体サブタイプを介して起こっていたことを示唆している。

8. 考察

本研究では、NA が単独投与によっては電流を発生させることなく NA 濃度依存性 (図 5a) に、 α_1 受容体を介して (図 8) ICAF を増強することが示された。NA 投与で膜電流は全く生じないにも関わらず、NA は単独投与により CAF 単独投与と類似した $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をもたらしたが、NA は CAF による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を増強することはなかった。(図 7) このことは、NA が細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から細胞質内へのCAF惹起性 Ca^{2+} 放出の段階ではなく、BK channel 活性に直接影響していることを示唆している。

図 4 に示したように、今回の検討においては新鮮単離のウシ CM 細胞の ICAF は、その逆転電位から純粋な K^+ 電流であり、ICAF がリアノジンまたサブシガルギン感受性細胞内 Ca^{2+} 放出によって生じる TEA また ChTx 感受性、アパミン非感受性の KCa channel 電流であるという、同じくウシ CM 細胞を用いた以前の報告とも一致する²⁷⁾。

ICAF に対する NA 作用のタイムコースには、細胞内二次伝達物質経路の関与が考えられる。NA による ICAF 増強の程度は細胞によりバラついたが、増強された ICAF は全ての CM 細胞において 30 分以内には徐々にコントロールの電流振幅へと回復した。(図 5b)

アドレナリン受容体によって媒介されるイオン電流修飾からの時間依存性の回復に関しては 2 つの例が良く知られている。心臓の β_1 アドレナリン受容体が媒介する voltage-gated Ca^{2+} 電流 (I_{Ca}) の増強には、cyclic-AMP 依存性 protein kinase (PKA) の活性化が関与し、増強効果からの完全な回復には β 受容体作動薬の除去より数十分以上を必要とする³⁸⁾。一方、脊椎神経における α_2 受容体作動薬による I_{Ca} の抑制は、GTP 結合蛋白によって直接媒

介されており、その効果は作動薬の除去後すぐに消失する^{39, 40, 41)}。 NA による ICAF の増強にも、GTP 結合蛋白のような直接の作用の関与ではなく、cAMP 依存性経路のような間接的なメカニズムの関与が考えられる。

ウシ CM 細胞における ICAF は、IK また BK type K_{Ca} channel によって発生する²⁷⁾が、NA による増強作用が、この電流発生のどの過程で生じているか明らかにすることは重要である。

NA による増強を受けた ICAF の動態は活性化相、減衰相双方ともに著明な変化は認められなかったため、電流発生に関与している全ての IK また BK channel に対して、その gating property には変化を及ぼすことなく、等しく修飾が及んでいることを示唆している。(図 6、表 3)

NA による ICAF の増強には、CAF に対する細胞質内 Ca^{2+} シグナルの変化が関与していると考えられるが、図 7 に示したように NA が CAF による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に対してほとんど影響を及ぼさないことから、NA による ICAF の増強効果は、ICAF 発生に関与する K_{Ca} channel の段階で生じていることを示唆している。

近年の研究により、細胞内の特定機能に結びついた様々な Ca^{2+} シグナルがあることが言われている。 気道平滑筋では、 β 受容体の活性化により、従来より言われるように弛緩を生じるが、同時に cAMP 依存性のメカニズムを介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を生じており、この $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は筋収縮には関連していないことが報告されている⁴²⁾。

本研究において、ウシ CM 細胞において、NA が膜電流発生に関与しない $[Ca^{2+}]_i$ 上昇作用を有することを示した。(図 7) CAF、NA の両薬剤に対する $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、両剤の同時投与を行っても相加的ではなかった。(図 7) これらの結果は、両薬剤がそれぞれの効果を発現させるために類似の

Ca²⁺貯蔵部を利用しており、CAF-activated mode においてはその Ca²⁺放出が BK channel 電流の発生に関連しているが、NA-activated mode においては ICAF を増強するが BK channel 電流の発生には関連していないことを示唆している。

リアノジン感受性と、InsP₃ 感受性 Ca²⁺ 貯蔵部位は、空間的、機能的には異なるとされているが、部分的には重複しているとの報告もあり^{35, 43)}、ウシ CM 細胞においても、CAF また NA で活性化される Ca²⁺ 貯蔵部位が重複している、またはそれぞれの Ca²⁺ 貯蔵部位がお互いに抑制をかけていると考えられる。

眼科領域における薬物療法の観点から NA による ICAF 増強反応に関わる受容体サブタイプの決定は重要である。

図 8 に示したようにクロニジン（選択的 α_2 作動薬）、イソプロテレノール（ β 作動薬）、プラゾシン（選択的 α_1 遮断薬）を検討した結果から、ICAF に対する NA の作用が、 α_1 受容体を介していることが示された。

一般的に平滑筋組織標本においては、 α_1 受容体が媒介する反応は InsP₃-sensitive Ca²⁺ 放出を介して筋収縮を引き起こし^{17, 18, 19)}、 β_2 受容体が媒介する作用は cAMP 依存性のメカニズムを介して筋弛緩を生じることが知られている^{20, 21, 22, 23)}。コリン作動薬で収縮させたヒト CM においては、 α_1 と β_2 アドレナリン受容体の活性化により弛緩が生じる^{44, 45)}。ウシ CM 細胞における今回の検討では、ICAF の修飾に対して α_2 、 β_1 また β_2 受容体の関与はないと考えられた。(図 8)

NA による ICAF の増強の生理学的意義に関しては、さらなる検討が必要であるが、NA の ICAF 増強効果は、以下の 2 つの異なる生理機能に結びつくことが考えられる。第一点は、NA による [Ca²⁺]_i 上昇による収縮であり、

第二点は、NA により増強された ICAF が関与する膜の過分極による弛緩である。NA は CAF による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇をほとんど修飾しないので、ICAF の著明な増強、つまり膜の過分極の増強によって弛緩を生じるように考えられる。

血管平滑筋において NA による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は収縮を引き起こすが^{17, 18, 19}、CAF が引き起こす効果は様々であり、その効果は組織によって異なる。ラットの大動脈筋束においては、CAF によって収縮が生じるが⁴⁶、膀胱平滑筋の筋束では CAF により弛緩が生じる³⁵。ウシ CM 筋束においては、今回細胞内 Ca^{2+} 動員のツールとして使用した CAF も含めて、テオフィリン、イソブチルメチルキサチン (IBMX)、などのホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤は、CM の神経原性収縮は抑制するが、筋緊張自体への直接的な影響は各々で異なるとされている⁴⁷。

ヒトの伏在静脈平滑筋細胞では、IK および BK channel は筋弛緩に結びつく膜の過分極の制御において重要な役割を果たしている⁴⁸。フィゾスチグミンまたはアセチルコリンによって収縮させたヒト CM 筋束は、 α_1 アドレナリン作動薬であるフェニレフリン⁴⁴ また β_2 アドレナリン作動薬であるサルブタモール⁴⁵ によって弛緩する。今回の検討におけるウシ CM 細胞における NA の作用は、IK また BK 電流の増強を介して弛緩を生じると考えられる。

アドレナリンによる uveoscleral outflow の流出促進は、 α_1 アドレナリン受容体媒介による IK または BK channel 活性の増強が関与している可能性が考えられる。BK channel の平滑筋における役割に関しては、前述のように膜の安定化作用といわれているが、CM においても同様の作用を行っていると考えられる。

イヌ CM 細胞の細胞膜は電氣的に極めて安定で、消化管に見られるような自発放電はもちろん、通電によっても活動電位は発生しない⁴⁹。収縮反応は

主に receptor-operated Ca^{2+} channel (ROCC) からの Ca^{2+} 流入によるもので、電位依存性 Ca^{2+} channel からの Ca^{2+} 流入による収縮は全体の約 30% を占めるに過ぎないとの報告⁴⁹⁾や、ウシ CM においても Ca^{2+} 流入経路としては電位依存性 Ca^{2+} channel があまり重要な意義を有していないとの報告⁵⁰⁾があり、これらの事実は膜電位変化を起こすような外界の変化に対してこの筋が安定であることを示しており、このことによってピント調節という微妙な、しかもある程度速度を求められる運動を要求される CM の目的を達成していると考えられている。一方、前回の研究で、高濃度 K^{+} 投与による脱分極により開口し、細胞内への Ca^{2+} 流入経路として機能している、ジヒドロピリジン (DHP) 非感受性の何らかの電位依存性 Ca^{2+} channel が存在することを示した²⁷⁾。

これらのことから、NA は BK channel を活性化し、膜を過分極させることで、電位依存性 Ca^{2+} channel からの Ca^{2+} 流入を抑制する、また ROCC の活性化による脱分極に拮抗して膜の安定化を図る、すなわち副交感神経系作用による筋の興奮に抑制的に働いていると考えられる。

NA の点眼早期に見られる眼圧上昇の機序としては、 α_1 受容体刺激による房水排泄障害が指摘されており^{51, 52)}、最近開発された α_1 遮断薬である塩酸ブナゾシンは uveoscleral outflow の増加による眼圧下降作用を有するとされている⁵³⁾が、その作用機序に関しては CM 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が関与するとの考えもあるものの、詳細は分かっていない⁵⁴⁾。

健常ヒト眼においては、uveoscleral outflow は conventional outflow を補う流出経路でしかないが、しかし、原発開放隅角緑内障などの病態においては conventional outflow が低下しており、相対的に uveoscleral outflow の重要性が増していると考えられる。正常眼圧緑内障の場合は、conventional

outflow が常に低下しているわけではないが、conventional outflow を促進する眼圧下降薬では、その効果が眼圧と上強膜静脈圧の差に比例するために、正常眼圧からさらに下げることのできる眼圧幅は僅かである。 それに対して uveoscleral outflow を促進する眼圧下降薬では、上脈絡膜腔の圧（約 4mmHg）以上の眼圧であれば、眼圧値に関わらず眼圧下降が期待できる。 また uveoscleral outflow には房水産生のような日内変動の存在はいわれていないため、uveoscleral outflow からは昼夜を問わず眼圧下降効果が期待できる。

調節は、交感神経系と副交感神経系の平衡状態から成立していると考えられ、positive accommodation は副交感神経系、negative accommodation は交感神経系が関与しているとされる⁵⁵⁾。 CM の二重支配を支持する事実も多く報告されているが、交感神経系が調節に影響を及ぼすには副交感神経系の刺激が必要とも言われている⁵⁶⁾。 また、交感神経系は調節ステップ応答の急速な変化を必要とする調節（捕捉成分）ではなく、調節応答の目標値への正確な調整（保持成分）に関与すると推定されており⁵⁷⁾、交感神経系の作用は、副交感神経系の補助として重要な役割を果たしていると考えられる。

また、近年では、調節の二次的作用として、過度の CM の緊張が眼球内部構造の前方牽引、変形を来し、近視性の変化を引き起こすとされている^{58, 59)}。

上記のような最近の知見より、CM は交感神経系また副交感神経系の刺激のバランスにより、眼圧や調節を制御し、さらには近視の発生に関与する可能性もあり、その筋緊張や細胞内 Ca^{2+} 動態に影響を及ぼす薬剤の薬理的・生理学的検討は非常に重要である。

BK channel 活性を修飾する因子としては、cAMP⁶⁰⁾ また cAMP 依存性 protein kinase (PKA)⁶¹⁾、cGMP、cGMP 増加を来す NO や EDRF⁶²⁾、PKC⁶³⁾ などが知られている。 PKA は G 蛋白の直接関与なしに、リン酸化非依存

性のメカニズムによって、 $[Ca^{2+}]_i$ 依存性に、BK channel の開口確率を増加させ⁶¹⁾、NO や EDRF による BK channel 活性化は、チャンネルのリン酸化によっていると考えられている⁶²⁾。

本研究では、NA により増強を受けた ICAF の動態の解析より、この増強作用に何らかの細胞内二次伝達物質が関与している可能性が示唆されたが、受容体の同定により α_1 受容体を介した反応であることが判明したため、現在のところ細胞内二次伝達物質としては PKC の関与を最も考えている。しかし、ラット尾動脈平滑筋細胞において、PKC は局所 Ca^{2+} 放出には影響を与えず、BK channel に対する直接作用によって BK channel を抑制することが報告されている⁶³⁾。眼科領域においても CCh によって収縮させたウシ CM の筋束での検討において、PKC 阻害剤では CM 筋束には変化を認めない、PMA によって CM 筋束に緩徐な収縮を認める、との報告⁶⁴⁾があり、今回の BK channel 活性化作用に PKC が関与しており、さらには筋弛緩を生じるであろうという予想とは矛盾しており、種差を含め今後の検討の必要があると考えられる。

9. 結語

酵素処理により新鮮単離した CM 細胞において、NA が α_1 受容体を介し ICAF を濃度依存性に増強することを示した。CM の筋緊張は、調節、眼圧を制御し、また近視の進行にも関与する可能性が示唆されており、CM の筋緊張に影響を及ぼす薬剤、およびそのメカニズムの理解は、眼科臨床において非常に重要な問題である。

本研究からは、NA は CM の弛緩を増強していることが推察されるが、この α_1 受容体を介した BK channel の増強作用が、生体内の CM の筋緊張にどのような影響を及ぼしているかに関しては、さらなる検討の余地があり、単離細胞を対象としたパッチクランプ法による実験の欠点も補うためにも、今後は組織全体としての収縮機能を温存した筋束を用いた収縮実験にて、薬剤に対する反応等の検討を行っていく必要があると考えられる。さらに、この NA 増強の作用を媒介する細胞内二次伝達物質の特定も課題の一つであると考えられる。

10. 参考文献

- 1) Ehinger B : Adrenergic nerves to the eye and a related structures in man and in the cynomolgus monkey (*Macaca irus*). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 5, 42-52, 1966.
- 2) Ruskell GL : Sympathetic innervation of the ciliary muscle in monkey. *Exp Eye Res* 16, 183-190, 1973.
- 3) Expression of muscarinic receptor subtype mRNA in the human ciliary muscle. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1645-57, 1995.
- 4) Cogan DC : Accommodation and the autonomic nervous system. *Arch Ophthalmol* 18, 739-766, 1937.
- 5) Gilmartin B, Hogan RE : The relationship between tonic accommodation and ciliary muscle innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1024-1028, 1985.
- 6) Zetterstrom C : Effect of adrenergic drug on accommodation and distant refraction in daylight and darkness. *Acta Ophthalmol* 66, 58-64, 1988.
- 7) 三輪隆, 深川和宏, 所敬 : 交感神経系薬剤の調節安静位に及ぼす影響. *日眼会誌* 92, 1235-1241, 1988.
- 8) Rosenfield M, Gilmartin B : The influence of alpha- adrenergic agents on tonic accommodation. *Curr Eye Res* 9, 267-272, 1990.
- 9) 大塚紀佳, 吉富健志, 土屋邦彦, 鶴飼一彦, 石川哲 : 自律神経作動薬の調節に及ぼす影響 - 交感神経作動薬の屈折および調節への影響-. *日眼会誌* 101, 400-406, 1996.

- 10) Mittag TW : Adrenergic and dopaminergic drugs in glaucoma. In *The Glaucoma*, ed by Ritch R. St Louise, CV Mosby, 523, 1989.
- 11) 谷口徹 : 房水のぶどう膜強膜流 - 構造と薬物作用について-. 眼科診療プラクティス 緑内障の薬物療法, 文光堂, 2001.
- 12) Godfraind T, Miller RC : Actions of prostaglandin F₂ alpha and noradrenaline on calcium exchange and contraction in rat mesenteric arteries and their sensitivity to calcium entry blockers. *Br.J Pharmacol* 75, 229-236, 1982.
- 13) McIntyre HJ, Temple DM : The effects of some bronchodilator and anti-inflammatory drugs on prostaglandin F₂alpha-induced contraction of guinea-pig isolated trachea. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 4, 165-171, 1977.
- 14) Roux JF, Mofid M, Moss PL, Dmytrus KC : Effect of elective induction of labor with prostaglandins F₂ alpha and E₂ and oxytocin on uterine contraction and relaxation. *Am J Obstet Gynecol* 127, 718-722, 1977.
- 15) Nilsson STE, Samuelsson M, Bill A, Stjernshwartz J : Increased uveoscleral outflow as a possible mechanism of ocular hypotension caused by prostaglandin F₂ α -1-Isopropylester in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 48, 707-716, 1989.
- 16) Gabelt BT, Kaufman PL : Prostaglandin F₂ α increases uveoscleral outflow in the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res* 49, 389-402, 1989.
- 17) Langlands JM, Diamond J : The effect of phenylephrine on inositol 1,4,5-trisphosphate levels in vascular smooth muscle measured using a protein binding assay system. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 1258-

1265, 1990.

18) Hashimoto T, Hirata M, Itoh T, Kanmura Y, Kuriyama H : Inositol 1,4,5-trisphosphate activates pharmacomechanical coupling in smooth muscle of the rabbit mesenteric artery. *J Physiol* 370, 605-618, 1986.

19) Somlyo AV, Bond M, Somlyo AP, Scarpa A : Inositol trisphosphate-induced calcium release and contraction in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 5231-5235, 1985.

20) Torphy TJ : Beta-adrenoceptors, cAMP and airway smooth muscle relaxation: challenges to the dogma. *Trends Pharmacol Sci* 15, 370-374, 1994.

21) Kume H, Hall IP, Washabau RJ, Takagi K, Kotlikoff MI : Beta-adrenergic agonists regulate K_{Ca} channels in airway smooth muscle by cAMP-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest* 93, 371-379, 1994.

22) Baldwin DR, Sivardeen Z, Pavord ID, Knox AJ : Comparison of the effects of salbutamol and adrenaline on airway smooth muscle contractility in vitro and on bronchial reactivity in vivo. *Thorax* 49, 1103-1108, 1994.

23) Kirkpatrick CT. Tracheobronchial smooth muscle, In: Bulbring E, Brandins AF, Jones AW, Tomita T. *Smooth Muscle*, London, Edward Arnold; 385-395, 1981.

24) Brenner R, Perez GJ, Bonev AD, Eckman DM, Kosek JC, Wiler SW, Patterson AJ, Nelson MT, Aldrich RW : Vasoregulation by the beta1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876,

2000.

- 25) Vogalis F, Vincent T, Qureshi I, Schmalz F, Ward MW, Sanders KM, Horowitz B : Cloning and expression of the large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel from colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 271, 629-639, 1996.
- 26) Porter VA, Bonev AD, Knot HJ, Heppner TJ, Stevenson AS, Kleppisch T, Ledrer WJ, Nelson MT : Frequency modulation of Ca^{2+} sparks in involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol* 274, 1346-1355, 1988.
- 27) Fujii T, Tokutomi N, Hirata A, Negi A, Nishi K. Cytoplasmic Ca^{2+} mobilization and Ca^{2+} -dependent membrane currents in dispersed bovine ciliary muscle cells. *Curr Eye Res* 16, 436-444, 1997.
- 28) Ohta T, Ito S, Nakazato Y. All-or-nothing responses to carbachol in single intestinal smooth muscle cells of rat. *Br.J Pharmacol* 112, 972-976, 1994.
- 29) Iino M, Yamazawa T, Miyashita Y, Endo M, Kasai H : Critical intracellular Ca^{2+} concentration for all-or-none Ca^{2+} spiking in single smooth muscle cells. *EMBO J* 12, 5287-5291, 1993.
- 30) Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesse D, Gabbiani G : A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103, 2787-2796, 1986.
- 31) Carbone E, Lux HD : Kinetics and selectivity of a low-voltage-activated calcium current in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386, 547-570, 1987.

- 32) Horn R, Marty A : Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92, 145-159, 1988.
- 33) Wakamori M, Hidaka H, Akaike N : Hyperpolarizing muscarinic responses of freshly dissociated rat hippocampal CA1 neurones. *J Physiol* 463, 585-604, 1993.
- 34) Tokutomi Y, Tokutomi N, Nishi K : The properties of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release in mouse gastric smooth muscle cells. *Br.J Pharmacol* 133, 125-137, 2001.
- 35) Sugita M, Tokutomi N, Tokutomi Y, Terasaki H, Nishi K : The properties of caffeine- and carbachol-induced intracellular Ca^{2+} release in mouse bladder smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 348, 61-70, 1998.
- 36) Shields MB. Adrenergic Inhibitors. In:Carol LB. Text book of Glaucoma 3rd ed. Maryland:Williams & Wilkins; 480-499, 1992.
- 37) Shields MB. Adrenergic stimulators. In:Carol LB. Text book of Glaucoma 3rd ed. Maryland:Williams & Wilkins;462-479, 1992.
- 38) Hill B. Modulation, slow-synaptic action, and second messengers. In:Hill B. Ionic Channels of Excitable Membrane, Sunderland, USA, Sinauer Associates; 170-201, 1992.
- 39) Lipscombe D, Kongsamut S, Tsien RW : Alpha-adrenergic inhibition of sympathetic neurotransmitter release mediated by modulation of N-type calcium-channel gating. *Nature* 340, 639-642, 1989.
- 40) McFadzean I, Mullaney I, Brown DA, Milligan G :Antibodies to the GTP binding protein, G_O , antagonize noradrenaline-induced calcium current

inhibition in NG108-15 hybrid cells. *Neuron* 3, 177-182, 1989.

41) Marchetti C, Carbone E, Lux HD : Effects of dopamine and noradrenaline on Ca^{2+} channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflügers Arch* 406, 104-111, 1986.

42) Rasmussen H, Kelley G, Douglas JS : Interactions between Ca^{2+} and cAMP messenger system in regulation of airway smooth muscle contraction. *Am J Physiol* 258, 279-288, 1990.

43) Golovina VA, Blaustein MP : Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science* 275, 1643-1648, 1997.

44) Lograno MD, Reibaldi A : Receptor-responses in fresh human ciliary muscle. *Br.J Pharmacol* 87, 379-385, 1986.

45) Zetterstrom C, Hahnenberger R : Pharmacological characterization of human ciliary muscle adrenoceptors in vitro. *Exp Eye Res* 46, 421-430, 1988.

46) Watanabe C, Yamamoto H, Hirano K, Kobayashi S, Kanaide H : Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. *J Physiol* 456, 193-213, 1992.

47) 芳野秀晃 : 交感神経関連薬の房水流出率への効果__毛様体筋との関連から. *日眼会誌* 97, 162-168, 1993.

48) Milesi V, Aiello EA, Rebolledo A, Gomez Alvis A, Grassi de Gende AO : Role of a Ca^{2+} -activated K^{+} current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 437, 455-461, 1999.

- 49) Ito Y, Yoshitomi T : Membrane and contractile properties of the dog ciliary muscle. Br J Pharmacol 78, 591-597, 1983.
- 50) Masaaki K, Eiichi S : L-type voltage-dependent Ca^{2+} and ATP-sensitive K^{+} channels are not involved in the regulation of bovine ciliary muscle contractility. J Ocul Pharmacol 11, 553-563, 1995.
- 51) Liu JHK, Dacus AC, Bartels SP : Adrenergic mechanism in circadian elevation of intraocular pressure in rabbits. Invest Ophthalmol Vis Sci 32, 2178-2183, 1991.
- 52) Murray DL, Leopold IH : Alpha-adrenergic receptors in rabbit eye. J Ocular Pharmacol Ther 1, 3-18, 1985.
- 53) Nishimura K, Kuwayama Y, Matsugi T, Sun N, Shirasawa E : Selective suppression by bunazosin of alpha-adrenergic agonist evoked elevation of intraocular pressure in sympathectomized rabbit eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 34, 1761-1766, 1993.
- 54) Mittag TW : Adrenergic and dopaminergic drugs in glaucoma. The Glaucoma, 2nd ed, CV Mosby, St Louise, 1409-1448, 1995.
- 55) Toates FM : Accommodative function of the human eye. Physiol Rev 52, 828-863, 1972.
- 56) Garner LF, Brown B, Baker R, Colgan M : The effect of phenylephrine hydrochloride on the resting point of accommodation. Invest Ophthalmol Vis Sci 24, 393-395, 1983.
- 57) Glimartin B, Hogan RE, Thompson SM : The effect of timolol maleate on tonic accommodation, tonic vergence, and pupil diameter. Invest Ophthalmol Vis Sci 25, 763-770, 1984.

- 58) Moses RA : Adler's Physiology of the Eye. 291-310, C.V.Mosby, St.Louise, 1987.
- 59) Hogan MJ:Histology of the eye. 198-328, W.B.Sounders, Philadelphia. 1971.
- 60) Sandoshima J, Akaike N, Kanaide H, Nakamura M : Cyclic AMP modulates Ca^{2+} -activated K^{+} channel in cultured smooth muscle cells of rat aorta. Am J Physiol 255, 754-759, 1988.
- 61) Song Y, Simard JM : beta-Adrenoceptor stimulation activates large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in smooth muscle cells from basilar artery of guinea pig. Pflugers Arch 430, 984-993, 1995.
- 62) Pong W, Hoidal JR, Farrukh IS : Regulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in pulmonary vascular smooth muscle cells : role of nitric oxide. J Appl Physiol 81, 1264-1272, 1996.
- 63) Schubert R, Noack T, Serebryakov VN : Protein kinase C reduces the KCa current of rat tail artery smooth muscle cells. Am J Physiol 276, 648-58, 1999.
- 64) Hagen T, Jens UN, Michael N, Nikolaos EB, Friederike S, Olaf S, Michael W : The effect of protein kinase C on trabecular meshwork and ciliary muscle contractility. Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 3254-3261, 1999.