

## 9435 体液塩バランスにおける大腸の役割

助成研究者：鈴木 裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部）

共同研究者：林 久由（静岡県立大学 食品栄養科学部）

amiloride感受性起電性Na吸収は大腸後半部に存在し、aldosteroneで亢進することも知られている。今回このNa吸収機序に対するコリン作動性神経の調節に関して検討した。

【研究方法】aldosteroneを投与し高アルドステロン症にしたモルモットより遠位大腸を摘出、Ussing型のチャンバーに装着し、短絡電流 (Isc) 及びコンダクタンス (Gt) を測定した。

【研究結果】CCh(1mM)を漿膜側に滴下すると、Iscは急激に低下して5分以内に最低値に達し、その後漸増していった。同時に経上皮コンダクタンス (Gt) も有意に低下したがやがてCCh滴下前の値までもどっていった。このCChの効果はatropineを前投与しておくともみられなくなった。amiloride (0.1mM, 粘膜側) によりIscはほぼ0になるのでこの条件下ではIscの大部分は起電性Na吸収を反映する。amiloride存在下でCCh滴下すると、Iscの低下及びGtの低下はみられなくなった。以上のことは、CChがムスカリン受容体を介して大腸起電性Na吸収機序を抑制することを示している。次に電氣的フィールド刺激 (EFS)により大腸壁内神経を電気刺激した時のIscの変化を検討した。EFSによりIscは急激に増加して1分以内にピークに達し、その後急激に低下して刺激前値よりもさらに低値で安定化した。EFS終了後一度Iscは低下するが徐々に刺激前値へ戻っていった。amiloride 0.1 mM存在下でEFSを行うと、Iscの一過性の上昇が残った。神経遮断剤であるTTXを漿膜側に滴下後EFSを行うと、前述のような反応は全て消失した。このことから、EFSによる反応は壁内神経活性化を介するものであることが確かめられた。Atropine存在下でEFSを行うと、Iscの低下反応には有意に(約30%)小さくなった。このことは、粘膜下神経によるamiloride感受性起電性Na吸収の抑制には、コリン作動性神経と非コリン作動性神経の両者が関与することを示唆している。コリンエステラーゼ阻害剤のeserine 10  $\mu$ Mを漿膜側に滴下するとIscは穏やかに低下し、atropineにより回復した。atropine存在下でeserrineを滴下しても、Iscの低下はみられなかった。さらにamiloride存在下でもeserineによるIscの低下反応は消失した。

【結論】本研究の所見は、遠位大腸においてコリン作動性神経による起電性Na吸収のムスカリン受容体を介した抑制機序が存在することを示している。さらにそれ以外の神経伝達物質(受容体)を介する抑制機序も存在することが明らかになった。



## 9435 体液塩バランスにおける大腸の役割

助成研究者：鈴木 裕一（静岡県立大学 食品栄養科学部）

共同研究者：林 久由（静岡県立大学 食品栄養科学部）

## 【研究目的】

消化管における水電解質の吸収や分泌は、消化や栄養素吸収といった栄養生理学的な側面に関わっているのみならず、生体全体のイオンや水のバランスにも重要な役割を果たしている。特に大腸では、小腸で吸収された残りの水や電解質を再吸収することにより水電解質の糞便への喪失を防いでいる。

腸管におけるNa吸収に関していくつかの機序が存在することが知られている。そのうち起電性Na吸収と一般に呼ばれているNa吸収機序では、まず管腔側膜のNaチャンネルを通してNaが細胞内に入り、次いで血液側膜のNaポンプによりNaが体内に取り入れられる。このNa吸収に伴い経上皮的に電位変化が発生し、それを短絡電流変化として捕らえることが容易である。また、管腔側膜のNaチャンネルはamilorideでブロックされることが知られている（1）。

起電性Na吸収は大腸後半部に存在し、aldosteroneで亢進することも知られているおり、体液塩バランスに重要な関わりを持っている（1）（2）。今回このNa吸収機序に対する腸壁内コリン作動性神経による調節に関して検討した。

## 【研究方法】

体重250－800gの雄モルモットより摘出した遠位結腸を使用した。実験は、起電性Na吸収を促進させる目的でaldosteroneを投与し高アルドステロン症にした動物を用いて実験を行った。aldosterone（1.39 mM in saline）を実験前日夕方背中皮下に、さらに当日朝方大腿筋中に0.75ml/g体重だけ注射した。朝方注射後3－4時間経過した後、撲殺、直ちに正中切開し遠位大腸を摘出した。摘出した腸は速やかに切り開き、アクリル板上で2枚のスライドガラスを用いて粘膜を粘膜下層より剥離し、Ussing型のチャンバーに装着した。電氣的フィールド刺激を行ったときは、

神経を含む粘膜下層を残す目的で、標本はピンセットで筋層のみをはがすという操作により作成した。

標本は、窓の面積0.5cm<sup>2</sup>のチャンバーの間に挟み、リンゲル液10mlを入れた。短絡電流 (Isc) はvoltage-clamp system（日本光電）により測定した。同時に経上皮コンダクタンス (Gt) を3 mVの電圧パルスを与えることにより求めた。すべての実験において、内因性プロスタグランジン産生の影響を避けるためにindomethacine 10 μmを両側に、神経活性の影響を避けるためにtetrodotoxin (TTX) 0.3 μm、及び大腸に存在するClおよびKオン輸送活性を抑える目的でbumetanide 0.1 mMを、いずれも漿膜側に加えた。

電氣的フィールド刺激 (EFS) は、漿膜側表面にアルミホイル製の一對の半円形の電極を付着させ、電気刺激により標本内の神経を刺激した。

## 【研究結果】

### 1) ムスカリン作動薬carbachol(CCh)の効果

CCh(1mM)を漿膜側に滴下すると、短絡電流 (Isc) は急激に低下して5分以内に最低値に達し、その後漸増していった (図1)。同時に経上皮コンダクタンス (Gt) も有意に低下したがやがてCCh滴下前の値までもどっていった。

Amiloride 0.1mMを粘膜側に滴下すると、Iscは急激に低下しほぼ0になった。ゆえに、本実験条件下でのIscは大部分amiloride感受性の起電性Na吸収量を示す。amiloride在下でCCh(1mM)を滴下すると、Iscはわずかに上昇するのみで、低下はみられなくなった (図1)。Gtの低下も消失した。以上のことは、CChが大腸起電性Na吸収機序を抑制することを示している。

### 2) 電氣的フィールド刺激 (EFS)

EFSによりIscは急激に増加して1分以内にピークに達し、その後急激に低下して刺激前値よりもさらに低値で安定化した (図2)。EFS終了後一度Iscは低下するが徐々に刺激前値へ戻っていった。Gtの変化としては、EFS最中は刺激前値より増加していたが、EFS終了後は低下し刺激前値より小さくなった。その後徐々に刺激前値へ戻っていった。一方、amiloride 0.1 mM存在下でEFSを行うと、Iscの一過性の上昇とGtの上昇はみられたが、Iscが刺激前値よりも低下することはなかった。EFS

によりCl分泌が亢進することは知られており、Iscの増加反応はindomethacin や bumetanideでは完全には抑制しきれないCl分泌であると考えられる。Iscの低下成分がamiloride存在下で見られなくなったことは、EFSによりamiloride感受性起電性Na吸収の抑制が起こることを示唆している。EFS終了後一度Iscが低下するのは、EFSによるわずかなCl分泌促進が終了したことを意味するものであり、この時点が正味の起電性Na吸収抑制を表わすと考えられる。この時点の抑制率は $33.3 \pm 3.4\%$  ( $n = 5$ )であった。

神経遮断剤であるTTXを漿膜側に滴下後EFSを行うと、前述のような反応は全て消失した。このことから、EFSによる反応は神経を介するものであることが確認された。

Atropine ( $10 \mu\text{M}$ )を漿膜側に滴下すると幾分Iscは上昇した。その後にEFSを行うと、Iscの低下反応には有意に小さくなった（コントロール： $-95 \pm 20$ 、atropine： $-64 \pm 18 \mu\text{A}$ ）。このことは、粘膜下神経によるamiloride感受性起電性Na吸収の抑制には、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する刺激と、それ外の神経伝達物質（受容体）を介する刺激が関与することを示唆している。

コリンエステラーゼ阻害剤のeserine  $10 \mu\text{M}$ を漿膜側に滴下するとIscは穏やかに低下し、atropineにより回復した（図3）。atropine存在下でeserineを滴下しても、Iscの低下はみられなかった。一方、amiloride存在下でeserineを滴下してもこのIscの低下反応は消失した。従って、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介するamiloride感受性起電性Na吸収の抑制の存在がこの結果からも支持された。

## 【考察】

本研究は、遠位大腸においてコリン作動性神経による起電性Na吸収の調節機序が存在するか否かを明らかにすることを目指した。その結果、ムスカリン受容体を介する起電性Na吸収抑制機序が存在することが明らかになった。即ち、ムスカリン作動薬CCh投与によりamiloride感受性のIscが低下した。この低下反応は、アトロピンで完全に抑制された。次に、粘膜を支配する神経により実際ムスカリン受容体を介したNa吸収抑制が起こるのかどうかを検討したところ、粘膜下神経を電気刺激するとamiloride感受性のIscの抑制が起こることが示され、粘膜下神経による抑制性の調節の存在が明らかになり、さらにムスカリン受容体を介したコリン作動性神経による抑制と、それ以外の神経伝達物質（受容体）を介する神経抑制の少なくとも2つのルートがあることが明らかになった。腸壁内神経がコリン作動性神経と非コリン作動

性神経からなることはよく知られている(3)。

ムスカリン刺激による抑制は、amiloride感受性の起電性Na吸収機序の存在することの知られている組織の内のいくつかで報告されている。しかしその細胞機序に関してはほとんど明かにされていない(4)(5)(6)。

ムスカリン受容体を介したNa吸収抑制の細胞機序に関しては本研究では検討しなかったが、ムスカリン受容体を介する反応は一般に細胞内Caを上昇させることが知られている。Caイオンの関与を今後明かにしなければならない。又作用点として、管腔側膜のNaチャンネルの抑制、側底膜のKチャンネルの抑制、側底膜のNa,K-ATPaseの抑制等が考えられる。これらのどの変化が最も抑制反応に重要であるのかが明かにされなければならない。

#### 【今後の課題】

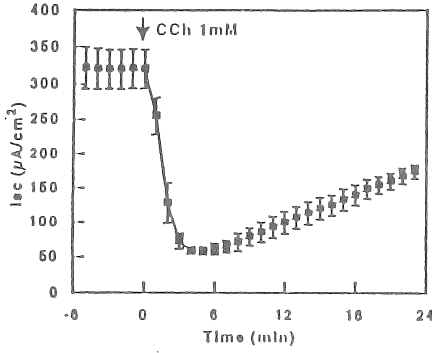
ムスカリン受容体を介する反応は一般に細胞内Caを上昇させることが知られている。Caイオンの関与を今後明かにしなければならない。又作用点として、管腔側膜のNaチャンネルの抑制、側底膜のKチャンネルの抑制、側底膜のNa,K-ATPaseの抑制等が考えられる。これらのどの変化が最も抑制反応に重要であるのかが明かにされなければならない。

Kイオンの吸収と分泌も大腸の重要な役割りの一つである。この細胞機序に関しては既にある程度明かになっているので、その神経やホルモンによる調節機序を明かにしていかなければならない。

#### 【参考文献】

- 1) Schultz, S.G. Ann. Rev. Physiol. 46:435-451, 1984
- 2) Fromm, M., Schulzke, J.D., and Hegel, U. Am. J. Physiol. 265:E48-E73, 1993.
- 3) Furness, J.B. and Costa, M. In: The enteric nervous system, ed by Furness and Costa, Churchill Livingstone, 1986.
- 4) Cuthbert, A.W. and Wilson, S.A. J. Membrane Biol. 59:65-75, 1981.
- 5) Sahib, M.K., Schwartz, J.H. and Handler, J.S. Am. J. Physiol. 236:F586-F591, 1978.
- 6) Venglarik, C.J. and Dawson, D.C. Am. J. Physiol. 251:C563-C570, 1986.

A Control



B Amiloride 0.1mM 管腔側存在下

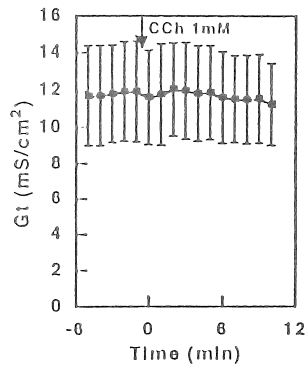
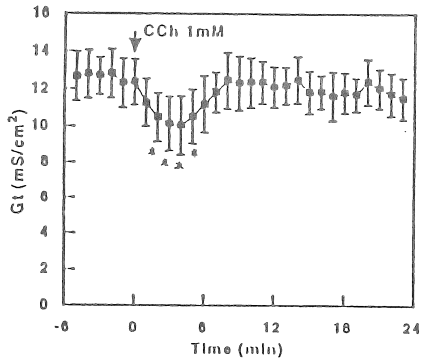
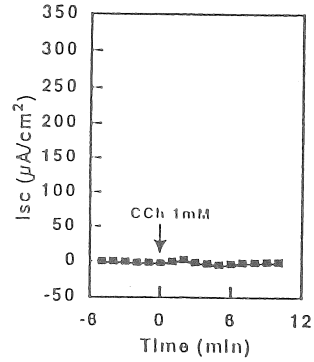


Figure 1. Effect of carbachol on short-circuit current (Isc) and transepithelial conductance (Gt). A: Control. B: Amiloride (0.1 mM, mucosa).

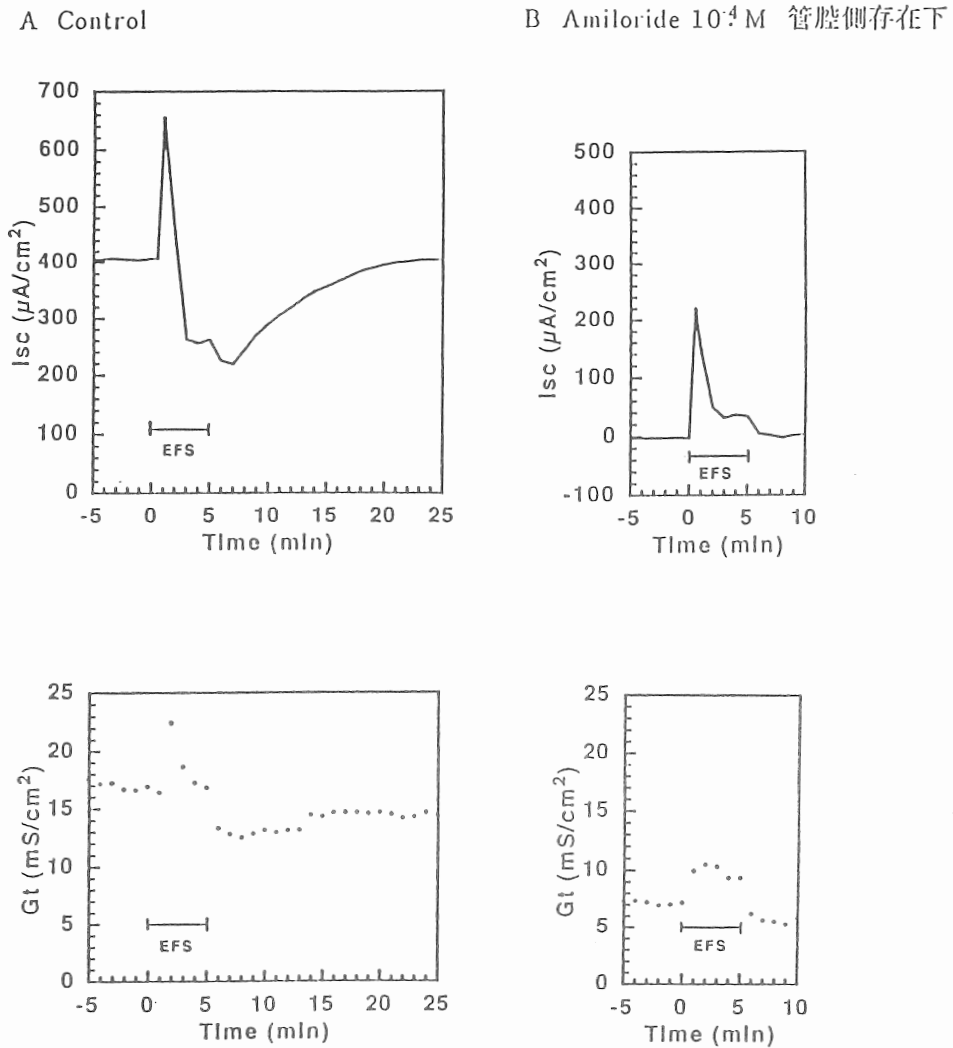


Figure 2. Effect of electrical field stimulation (EFS) on short-circuit current (Isc) and transepithelial conductance (Gt). A: Control. B: Amiloride (0.1 mM, mucosa).



A Control

B Amiloride  $10^{-4}$  M 管腔側存在下

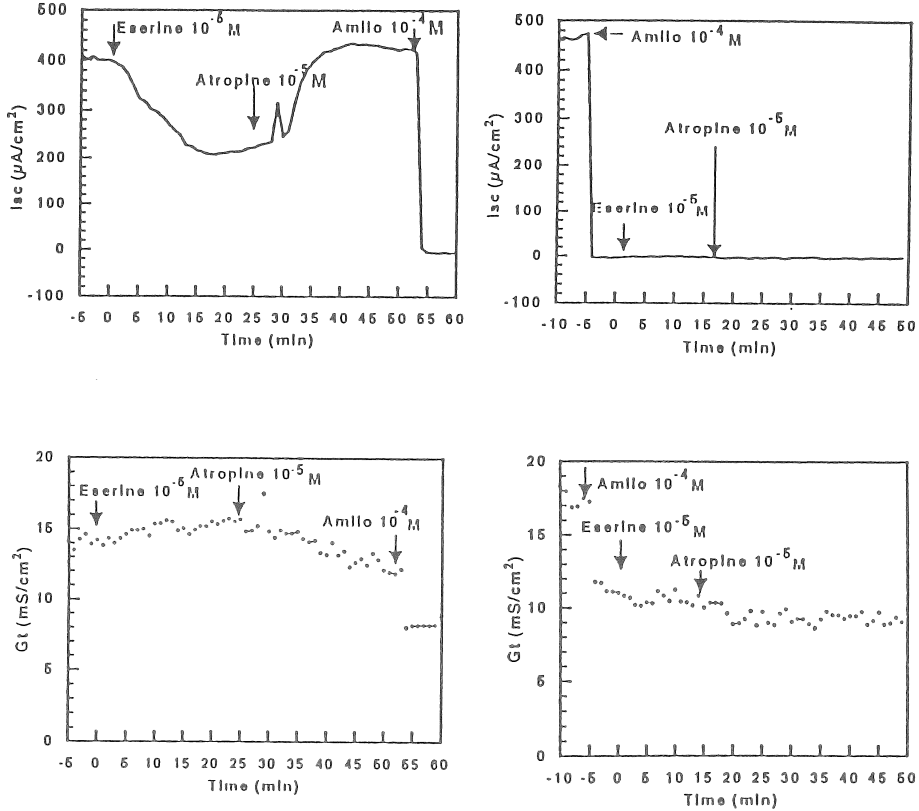


Figure 3. Effect of eserine ( $10 \mu\text{M}$ , serosa) and inhibition by atropine ( $10 \mu\text{M}$ , serosa) on short-circuit current (Isc) and transepithelial conductance (Gt). A: Control. B: Amiloride ( $0.1 \text{ mM}$ , mucosa).

## Regulation of salt balance by large intestine

LYuichi Suzuki and Hisayoshi Hayahshi

ab. Physiol. Sch. of Food and Nutrition, Univ of Shizuoka, Shizuoka

### Summary

There is an electrogenic Na absorption in the distal colon, which is activated by aldosterone and inhibited by low concentration of amiloride. We have investigated whether electrogenic Na absorption is regulated by intramural neurons in the guinea pig distal colon in vitro under short-circuit conditions. Carbachol (CCh, 1 mM, serosal side) reduced I<sub>sc</sub>. This effect of CCh was abolished by atropine (10 mM, serosa). When the component of I<sub>sc</sub> due to an electrogenic Na absorption was suppressed by amiloride (0.1 mM, mucosal side),

The I<sub>sc</sub> decrease by CCh was completely abolished. Electrical stimulation of the preparations elicited a transient increase followed by a decrease in I<sub>sc</sub>. These responses were abolished by tetrodotoxin (0.3 mM, serosal). Mucosal amiloride abolished the decreasing component of the I<sub>sc</sub> change by electrical stimulation. Both the increase and the decrease in I<sub>sc</sub> by electrical stimulation was significantly attenuated by atropine. It is concluded that the submucosal cholinergic neurons are involved via muscarinic receptors in the inhibition of electrogenic Na absorption.