

9742 皮膚上皮細胞の食塩受容作用の生理学的研究

助成研究者：長井 孝紀 (帝京大学 医学部)

共同研究者：小山 洋道 (横浜市立大学 看護短期大学部)

スタンリー・ヒリアート (ネヴァダ大学 生物科学部)

カエルは水を口から飲まず、その皮膚を通して浸透圧の作用で水を吸収する。脱水すると、乾燥地に棲むヒキガエルは、腹部の皮膚を湿った地面に押し付けて水分を吸収するという特徴的な行動(飲水行動)を示す。しかし、脱水したヒキガエルは高張のNaClやKCl溶液で湿っている部分は避ける。これらの行動を生理学的に説明するために、ヒキガエルが塩類の溶液を識別する機序を研究した。不動化したヒキガエル(*B. alvarius*)を用い、腹部の皮膚を支配する脊髄神経の活動を記録すると、食塩溶液に対しおよそ200mMを閾値として応答した。応答の潜時は遅く2-3秒もあり、刺激の濃度上昇にともなって潜時は減少した。われわれは先に蛍光色素diiを用いて脊髄神経末端の構造を調べ、この末端が受容細胞ではないかと思われる細胞を支配していることを明らかにしている。これらの構造は皮膚の深い層に位置しているので、これが刺激の受容部位であると考え、神経応答の潜時は説明できよう。食塩刺激に対する応答は、上皮細胞や食塩の味受容膜でのナトリウムチャンネルに対する阻害剤であるアミロライド(10 μ M)で有意に減少した。食塩溶液に対する拒否行動も、溶液にアミロライドを加えることで抑制された。従って、ナトリウムイオンはヒキガエル皮膚に存在するアミロライド感受性Na⁺チャンネルを通して、刺激の受容部位に流入すると考えられる。ヒキガエルはその生存環境にある高張の塩溶液を検出できることから、今まで知られていなかった脊髄神経の化学受容作用が明らかになった。

9742 皮膚上皮細胞の食塩受容作用の生理学的研究

助成研究者：長井 孝紀 (帝京大学 医学部)

共同研究者：小山 洋道 (横浜市立大学 看護短期大学部)

スタンリー・ヒヤート (ネバダ大学 生物科学部)

研究目的

カエルは浸透圧を利用して、皮膚から水分を吸収する¹⁾。乾燥地に棲息するヒキガエルは、水分を吸収するため腹部の皮膚をできるだけ広く湿った地面に接触させる。この特異な飲水行動は water absorption response (WR) と呼ばれ、実験室内でも再現される²⁾。しかし、水源として純水でなく、食塩を含む溶液を与えると、WR行動は抑制され、この水源から逃避する。すなわち、ヒキガエル (*Bufo punctatus*) は食塩を含む溶液を識別している。このことから、Hoff と Hillyard はこのヒキガエルは腹部の皮膚に食塩水を検出する感覚受容器を持つのではないかと示唆した³⁾。われわれは脊髄神経に蛍光色素 diI を与え、神経の支配領域の腹部皮膚の構造を調べたところ、示唆されている受容器と思われる構造を発見した⁴⁾。ヒキガエルの飲水行動では、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルに対するブロッカーであるアミロライドを食塩水に加えておくと、この溶液を拒否せず WR 行動は回復する³⁾。したがって、食塩水に対する逃避行動は、アミロライド感受性ナトリウムチャンネルを通過して皮膚内に流入したナトリウムイオンによって引き起こされたと想像される。そこで、ヒキガエルの脊髄神経の化学刺激に対する応答とアミロライドの効果を調べ、皮膚の食塩受容作用の機序を生理学に明らかにしようとした。

研究方法

実験動物はアメリカ、アリゾナ州南西部の乾燥地帯で採集したヒキガエル (Colorado river toad, *Bufo alvarius*) を用いた。

ヒキガエルの腹部は脊髄神経の5、6、7番によって神経支配されている。2重ピスによってヒキガエルを不動化し、これらの脊髄神経のうち5、6番を露出した。2つの脊髄神経の末梢側の神経束から、多くの場合同時に活動電位を細胞外記録し、磁気テープに保存した。定性的な実験では化学刺激として、NaCl, KCl, CaCl₂, NH₄Cl, LiCl, MgCl₂ (それぞれ 0.5 M), citric acid (0.05 M) を用いた。定量的な実験ではNaCl (0.1 - 0.5M), KCl (0.1 - 0.3M) を15秒間、腹部の皮膚に与えた。刺激と刺激の間は 2分以上休息させ、1mM NaCl を含む洗浄液を流した。アミロライドの効果を調べる実験では、対照となる神経応答を記録後、腹部皮膚を 10 μM のアミロライドに 5分間露出させたのち化学刺激に対する応答を記録した。刺激液、洗浄液、アミロライド溶液はペリスタルチックポンプによって

一定の流速で与えた。神経応答の定量化には、積分回路(時定数 = 1.0 sec)を用い、応答の大きさは 0.3M NaCl に対する応答の大きさで正規化して表した。また、刺激の潜時を測定する場合には刺激する皮膚のごく近傍に電極を置き、これが刺激液自身によって接地される瞬間を電氣的に測定し、刺激の開始時とした。

研究結果

脊髄神経の5番、6番から同時記録すると、腹部皮膚の尾側に近い部位を刺激すると6番の神経から早い立ち上がりの応答が記録され、吻側への刺激では5番から早い応答が、というように明らかに受容野に依存した応答がみられた (Fig. 1)。食塩刺激に対する応答は5番と6番で定性的には差がなかった。

脊髄神経は体性神経であるので、皮膚に加えられた機械的刺激に対し、当然、応答した。さらに、化学刺激に対しても応答し、その応答様式は明らかに機械的刺激によるものとは異なっていた。潜時は機械刺激に比べ、極端に長く、0.5 M NaClでは3秒近い場合があった。この潜時は刺激の濃度が高くなると短くなり、NaClが拡散過程により刺激受容部位に到達していることを示唆した。0.5 Mの各種塩類で刺激すると、NaClとKClが有効であり、CaCl₂などの塩類は刺激効果がほとんどなかった。また、塩類だけでなく、酸も有効刺激であった。0.1 MではNaCl, KClともに刺激効果はなくほぼ0.2 M以上で濃度依存的に増大する応答が得られた (Fig. 2)。KClの刺激効果は強く0.3 Mでは同濃度のNaClの約8倍の応答が記録された。

腹部皮膚をアミロライドで処理すると、NaCl刺激による応答は抑制され、食塩による脊髄神経応答にはアミロライド感受性ナトリウムチャネルの関与が示唆された (Fig. 3)。しかし、アミロライドはKClに対する応答も減少させたので、このチャネルのイオン選択性はあまり高くないと考えられた。アミロライド処理後の応答は処理前と比較して、NaClでは0% (0.2 M)、72% (0.3 M)、一方KClでは36% (0.2 M)、82% (0.3 M)であり、0.3 Mでの減少はNaCl, KClともに統計的に有意であった ($n=11$, $p<0.05$)。

考察

ヒキガエルの腹部皮膚をNaClで刺激すると、脊髄神経応答が濃度依存的に増大し、この応答の潜時は刺激濃度の増大によって減少したので、神経応答は刺激溶液が皮膚に接触する際の機械的刺激によるものではなく化学刺激によるものであろう。さらに、この応答はアミロライドによって抑制されたので、刺激液のナトリウムイオンは皮膚上皮細胞のアミロライド感受性ナトリウムチャネルを通過して拡散して行き、脊髄神経の興奮を起こさせるものと考えられる。

脊髄神経は本来、体性神経であり、味覚刺激物質を皮膚の外から与えた場合に、化学感受性を持つことは考えにくい。しかし、実験事実は化学感受性を持つ事を示した。脊椎動物では唯一、魚類だけが体表に脊髄神経に支配されている味蕾を持つことが知られ⁵⁾、dil

によってその味細胞と支配神経とのつながりが明らかである。ヒキガエルの場合 diI を用いても、味蕾と類似の構造物は上皮に見出されなかった。しかし、diI で標識された細胞が見出された⁴⁾。この細胞は胚芽層に分布し、外界に直接面していないので (Fig. 4)、これが仮に化学受容細胞だとしても、味細胞のような受容機構は想定し難い。カエルの上皮ではアミロライド感受性 Na チャネルが存在し、Na イオンを輸送していることが知られているので^{6・8)}、上皮細胞層を通過してきた Na イオンが胚芽層付近まで到達し、脊髄神経に支配された胚芽層の細胞を刺激することは起こり得る。しかし、その細胞膜上での刺激変換機構は味細胞の場合とは異なり、イオン濃度の増加にともなう浸透圧の上昇による機械的刺激によるのかもしれない。一方、この細胞は刺激受容に直接関与せず、神経に付随的な構造物かもしれない。この場合、自由神経末端がイオンの流入による化学刺激かまたは機械刺激による刺激変換部位となろう。

NaCl についての神経生理実験は行動実験による WR 時間の測定結果と良く一致する。行動実験では、塩類溶液に対しては WR 行動の時間が著しく減少することが示された⁹⁾。250mM NaCl に対して、WR 行動の時間は純水に対する時間の 8.1%にまで有意に減少し ($n=16$, $p<0.001$)、 $10\mu\text{M}$ のアミロライドを加えた NaCl に対してはこの時間は 53% にまで有意に回復した。この回復は、アミロライドによって脊髄神経応答が抑制された結果、ヒキガエルは食塩の存在に気がつかないのだと解釈できよう。

KCl は脊髄神経に大きな応答を引き起こし、250mM KCl に対する WR 行動時間は 21% にまで減少した。ところがアミロライドを加えてやってもこの行動時間はほとんど変化がなく、このとき KCl による脊髄神経の応答はアミロライドによって抑制されていた。このような神経と行動実験との不一致の原因の一つは、神経応答の絶対量の違いであろう。0.3 M KCl による応答は NaCl の 8 倍もあり、アミロライドで抑制されたといっても、まだまだ大きく行動変化を引き起こすほどではなかったであろう。さらに、塩類のなかでも KCl に対する識別は NaCl に応答するニューロン群とは異なるニューロンの活動による可能性も考えられる。よく知られるように哺乳類の味覚神経を神経全体の積分応答で調べた場合、アミロライドは Na^+ イオンによる応答を抑えるが、NaCl に特異的でなく他の塩類にも応答する単一ニューロンに対しては抑えない¹⁰⁾。同様なことがヒキガエルの脊髄神経にもみられるかも知れない。単一ニューロンでの解析が待たれる。

今後の課題

アミロライド感受性ナトリウムチャネルに対する抗体を用いて皮膚上皮細胞層内でのチャネルの分布を明らかにする、食塩で刺激時 Na^+ イオン濃度の変化をイオン選択性電極やイオン感受性の蛍光色素等を用い測定する、などの方法で Na^+ イオンによるトランスダクション部位を明確にする。さらに、アミロライドは食塩刺激による応答を完全に抑制するわけではないので、この抑制されない部分の応答の解明、カリウムイオンによる神経応答の機構の解明、などが今後の課題である。

文 献

- 1) Bentley PJ and Yorio T: Do frogs drink? *J. exp. Biol.* 79:41-46 (1979)
- 2) Brekke DR, Hillyard SD and Winokur RM: Behavior associated with the water absorption response by the toad, *Bufo punctatus*. *Copia* 1991, 393-401 (1991)
- 3) Hoff KS and Hillyard SD: Toads taste sodium with their skin: sensory function in a transporting epithelium. *J. exp. Biol.* 183: 347-351 (1993)
- 4) 長井孝紀、小山洋道、Hillyard SD: カエル皮膚には塩味受容器があるかもしれない。日本味と匂学会誌 3: 330-332 (1996)
- 5) Kotrschal K, Whitear M and Finger TE: Spinal and facial innervation of the skin in the gadid fish *Ciliata mustela* (Teleostei). *J. Comp. Neurol.* 331, 407-417 (1993)
- 6) Lindemann B and Voute C: Structure and function of the epidermis, In Frog Neurobiology (Llinas R and Precht W eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 169-212 (1976)
- 7) Larsen EH: Chloride transport by high-resistance heterocellular epithelia. *Physiol. Rev.* 71: 235-283 (1991)
- 8) Katz U and Nagel W: Biophysics of ion transport across amphibian skin, In Amphibian Biology (Heatwole H ed.), Surrey Beatty & Sons, Chipping Norton, pp. 98-119 (1994)
- 9) Nagai T, Koyama H, Hoff KvS and Hillyard SD: Chemosensory function of the ventral skin in Colorado river toads. *Neurosci. Abstr.* 23: 250 (1997)
- 10) Hettinger TD and Frank ME: Specificity of amiloride inhibition of hamster taste responses. *Brain Res.* 513, 24-34 (1990)
- 11) Whitear M: The nerves in frog skin. *J. Zool., Lond.* 172: 503-529 (1974)

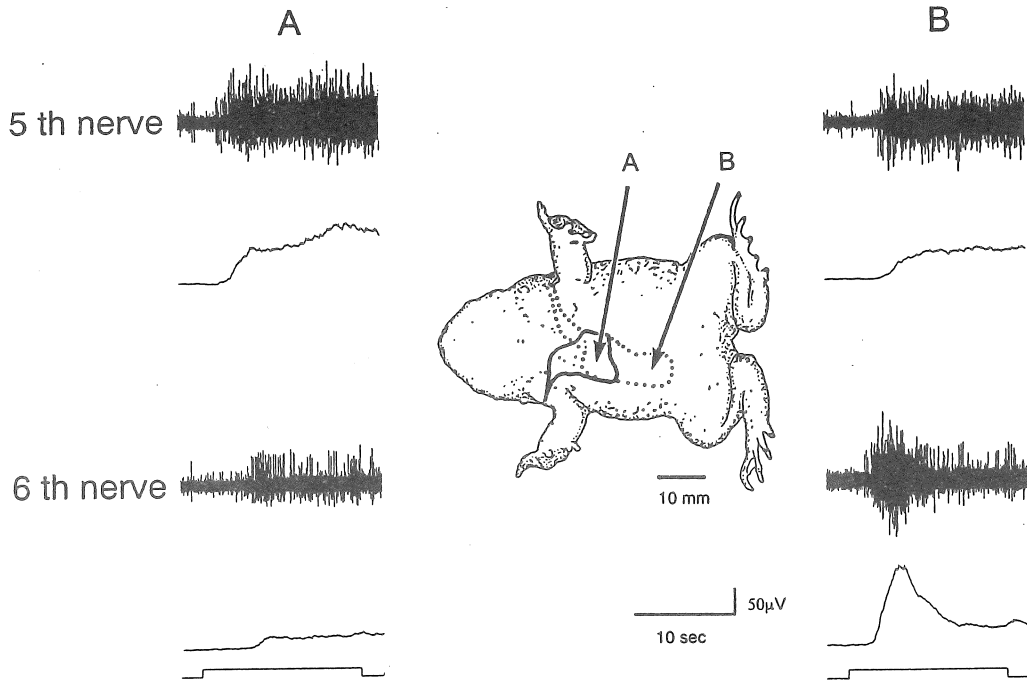


Fig. 1 Spinal nerve responses of toads. The fifth and sixth spinal nerves were simultaneously recorded when the area of ventral skin shown as either A or B was stimulated by 0.5 M NaCl. For each spinal nerve multiunit activity of the nerve and its integrated signal are shown. Marking for onset and offset of stimulation shown at the bottom trace applies to recordings of the fifth spinal nerve.

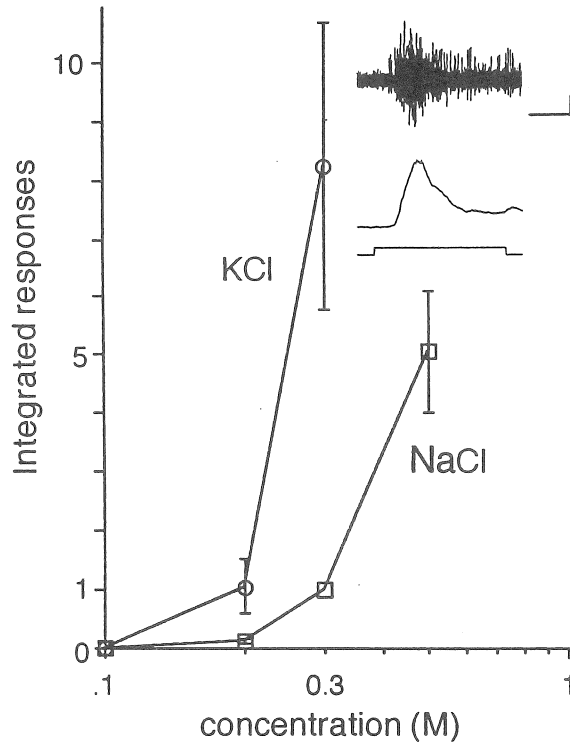


Fig. 2 Intensity-response curves for salt solution-induced responses recorded in the sixth spinal nerve. Inset, the response to 0.5 M NaCl and its integrated signal.

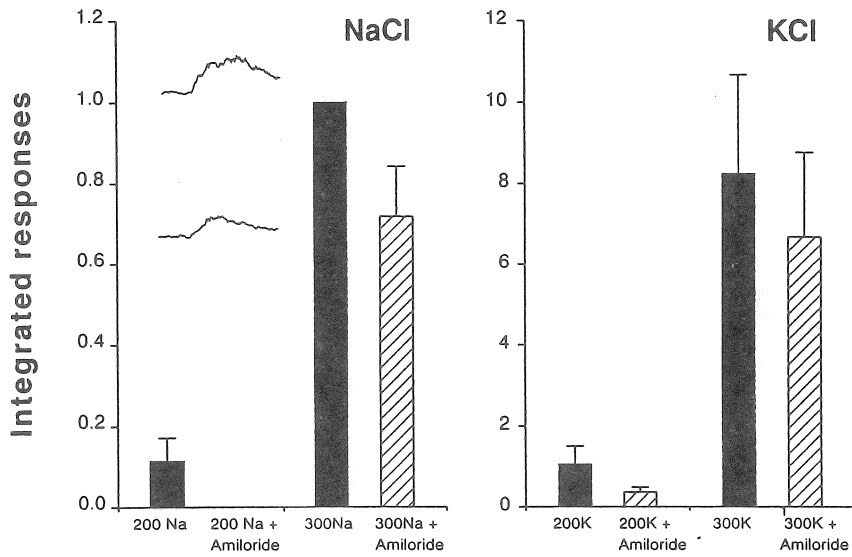


Fig. 3 Effect of amiloride on the sixth spinal nerve responses to NaCl and KCl. All responses are normalized to the response to 0.3 M NaCl. Inset, the response to 0.3 M NaCl (upper trace) and suppressed response after the skin was exposed to amiloride (lower trace).

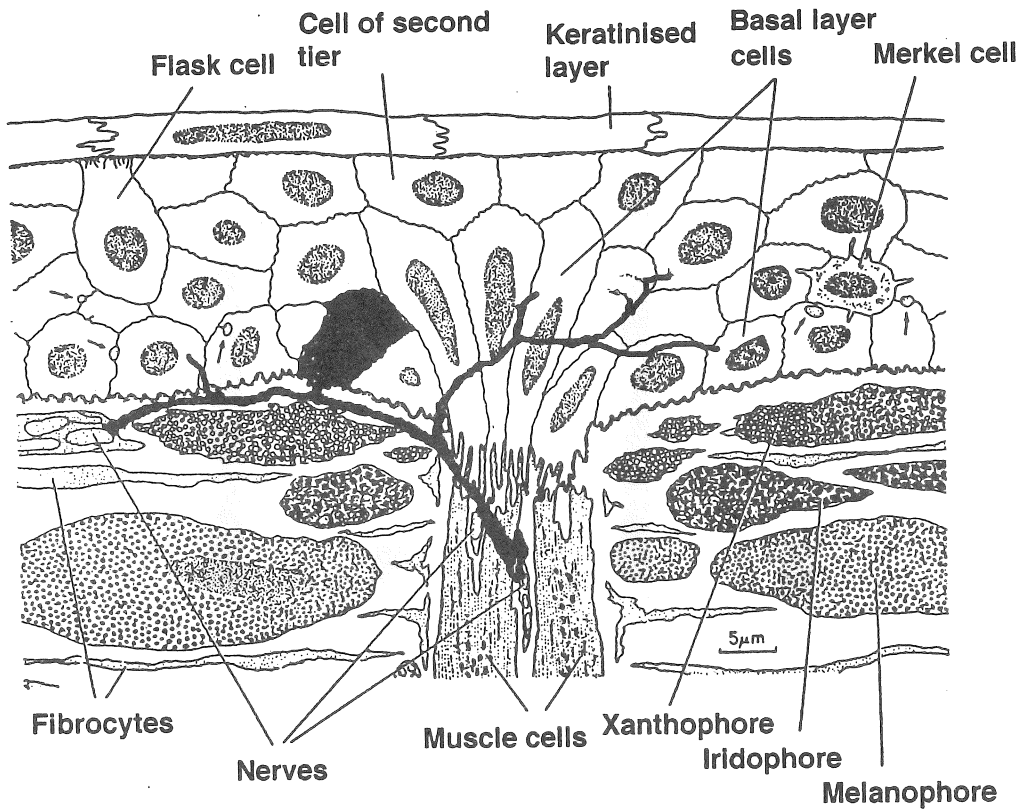


Fig. 4 Structure of the toad skin. Putative salt receptor cell and spinal nerve ending are superimposed on the diagram of the frog skin depicted by Whitear (1974)¹¹⁾.

Physiological study of sodium salt reception in the skin epithelium

Takatoshi Nagai

Department of Physiology, Teikyo University School of medicine

Hikomichi Koyama

College of Nursing, Yokohama City University

Stanley D. Hillyard

Department of Biological Sciences, University of Nevada

Summary

Toads do not drink orally, but obtain water by osmotic flow across their skin. When dehydrated, desert toads exhibit stereotyped hydration behavior in which they press their ventral skin onto a moist surface. However, dehydrated toads avoid surfaces moistened with hyperosmotic NaCl and KCl solutions. These observations made us to study physiological mechanism for the toads to discriminate salt solutions. In immobilized toads (*B. alvarius*) spinal nerves innervating the ventral skin responded to a NaCl solution applied on the skin at threshold around 200mM. Latency of the response was slow such as 2-3 seconds and decreased with increase of stimulus concentration. These characteristics are compatible to our previous demonstration with fluorescent dye diI that spinal nerve endings and putative receptor cells innervated by the spinal nerves were located in the deeper layer of the skin epidermis, if these structures are transduction sites. The response to NaCl was significantly reduced by amiloride (10 μ M), a blocker for Na⁺ channels responsible for epithelial ion transport and salt taste transduction. In behavioral experiments, avoidance of a NaCl solution was also reduced by adding amiloride to the solution. Therefore, Na⁺ ions flow into possible transduction sites through amiloride-sensitive Na⁺ channels that are known to exist in the toad skin. The ability of toads to detect hypertonic salt solutions in their environment reveals a previously unknown chemosensory function for spinal nerves in anuran amphibians.