

神経伝導障害発症機序の解明  
：ワセリンギャップ法を用いた  
膜電位固定法によるイオン透過性の検討

研究課題番号：05670555

平成6年度科学研究費補助金（一般研究C）研究成果報告書

平成7年3月

研究代表者 安田 齋  
(滋賀医科大学医学部講師)

## 緒言

神経伝導障害は多くの神経疾患の機能的側面であり、この伝導の本体はランビイェ絞輪部における活動電位である。そのため同部位の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ チャンネルの変化が伝導障害の原因として重要である。このイオン電流の変化を検討するためには、単一神経線維による検討が極めて有用であり、ワセリンギャップ法による膜電位固定法を実施することにより、初めて可能であると考えられる。

一方、糖尿病性神経障害の成因は多くの仮説が提唱されているが、いまだ全貌は明らかではなく、高血糖や高血糖に基づく代謝異常が電気生理学的機能異常を惹起させる機序についても不明な点が多いが、これを明らかにするためには生化学的検討と共にイオンチャンネルレベルの電気生理学的検討が必要であり、従来の神経束を対象とした検討では不十分である。他方、運動ニューロン疾患、ギラン・バレー症候群などでは血中抗GM1抗体の高値が報告され、神経伝導障害や神経障害への関与が推測されているが、その検討は神経束レベルでの電気生理学的検討にとどまっており、単一神経線維を用いた方法でイオンチャンネルの変化を検討する必要がある。

本研究では単一有髄神経線維を用いたワセリンギャップ法で、糖尿病性神経障害や抗神経抗体による伝導障害や病態を単一神経線維レベルでイオン透過性の変化として把握することにより明らかにして、有効な治療薬開発の一助としたい。

## 研究組織

研究代表者：安田 斎（滋賀医科大学医学部講師）

研究分担者：北里 宏（滋賀医科大学医学部教授）

研究分担者：寺田 雅彦（滋賀医科大学医学部助手）

## 研究経費

平成5年度	1 6 0 0 千円
平成6年度	4 0 0 千円
計	2 0 0 0 千円

滋賀医科大学附属図書館



1994020675

## 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) 瀧川智子、安田斎、繁田幸男、北里宏：ラット単一神経線維電気活動に及ぼす高濃度グルコースの影響と細胞内イオン濃度調節における $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ポンプの役割—膜電位固定法による検討—、糖尿病（印刷中）
- 2) Takigawa T, Yasuda H, Saida T, Kikkawa R, Shigeta Y: Antibodies against GM1 ganglioside affect  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  currents in isolated rat myelinated nerve fibers. Ann Neurol (in press)

### (2) 口頭発表

- 1) 佐々木智子、安田斎、寺田雅彦、前田憲吾、繁田幸男、北里宏：ラット単一神経線維の電気活動とグルコース濃度—膜電位固定法による検討、第29回糖尿病学会近畿地方会、平成4年10月31日
- 2) 滝川智子、安田斎、寺田雅彦、吉川隆一、繁田幸男、北里宏：糖尿病性神経障害におけるケトン体の影響、第37回糖尿病学会、平成6年5月11—13日
- 3) 滝川智子、安田斎、寺田雅彦、繁田幸男、斎田孝彦、北里宏：抗GM1抗体のイオンチャンネルに及ぼす影響—ラット単一有髄神経線維を用いた膜電位固定法による研究—、第35回日本神経学会総会、平成6年5月18—20日
- 4) 滝川智子、安田斎：抗GM1抗体の神経線維イオンチャンネルに対する影響、第36回日本神経学会総会（シンポジウム）、平成7年5月17—19日（発表予定）
- 5) Takigawa T, Yasuda H, Saida T, Terada M, Kikkawa R, Shigeta Y, Kitasato H: Antibody to GM1 ganglioside affect  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  currents in the rat myelinated fiber. The 1st Annual Meeting of Peripheral Nerve Society, June 13-16, 1994.
- 6) Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Kitasato H, Shigeta Y: Glucose and ketone bodies affect electrophysiological activity in rat myelinated nerve fiber. The 30th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, 28 September-1 October, 1994.

- 9) Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Kitasato H, Kikkawa R, Shigeta Y:  
Nerve dysfunction and compensatory role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump in high  
glucose condition: voltage clamp analysis in rat single myelinated  
nerve fiber. The Third International Symposium on Diabetic  
Neuropathy, November 3-5, 1994.

## 研究成果

### 1. 神経線維の電気活動に及ぼすグルコースの影響

- 1) 細胞外液に30mM、100mM、300mM D-グルコース及びL-グルコースを加えるとグルコース濃度依存性に活動電位は低下し、その程度は、L-グルコースの方が大であり、グルコースによる活動電位の低下は浸透圧効果と考えられた。
- 2) 高濃度グルコースの浸透圧効果をより明確に評価するため、神経断端部に3mMデキストランを加え断端部からの水の流入を阻止した場合、阻止しない場合と比べ、グルコース投与後の活動電位抑制時間が延長し、活動電位の低下は細胞容積減少と相関することが示唆された。
- 3) 細胞外に30mM D-グルコースまたはスクロースを加えると、活動電位及びNa<sup>+</sup>電流は一旦低下した後、一過性にコントロールレベルより上昇し、最終的に元のレベルにまで回復した。その変化の程度は細胞外にスクロースを加えた場合の方が大であった。グルコース投与後、Na<sup>+</sup> reversal potentialは約10mV減少した。
- 4) 30mM D-グルコースに0.1mM Ouabainを加え細胞外に与えると、活動電位及びNa<sup>+</sup>電流は一旦減少し、多少回復傾向を示すが、Ouabain非存在下にみられた活動電位及びNa<sup>+</sup>電流の上昇は認められず、その後進行性に低下し、K<sup>+</sup>電流は上昇した。

以上より、高濃度グルコースは浸透圧効果により濃度依存性に神経活動電位及びNa<sup>+</sup>電流を低下させた。この現象は、細胞外高浸透圧状態に起因した細胞容積の減少と細胞内Na<sup>+</sup>イオン濃度の上昇により、Na<sup>+</sup>平衡電位が低下した結果惹起されたと考えられる。また末梢神経では、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプが細胞容積の減少に起因した細胞内イオン濃度の是正に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。糖尿病ではNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ポンプの機能低下が存在することが報告されており、この結果細胞内にNa<sup>+</sup>イオンが蓄積し、活動電位の低下ひいては神経伝導機能障害が起こると推察される。今後、Ouabain存在下でのK<sup>+</sup>電流の上昇の機序につき検討を加える必要があると考えられる。

### 2. 神経線維の電気活動に及ぼす脂肪酸・ケトン体の影響

糖尿病においては血中の脂肪酸・ケトン体増加がみられ、これらの神経機能に及ぼす影響を検討した。

- 1) Stearic acid(SA)の影響：SAはNa<sup>+</sup>-channelのactivationの速度の上昇とK<sup>+</sup>電流の増大をもたらすと考えられた。
- 2) Methyl-n-butyl ketone(MBK)の影響：3mM, 5mMでは静止膜電位は変わらず、濃度依存性の活動電位振幅の低下がみられた。膜電流の変化としては、Na<sup>+</sup>電流の減少とK電流の増大が認められた。Na<sup>+</sup>電流をblockするとK<sup>+</sup>電流がやや増大した。3, 4-diaminopyridineでK<sup>+</sup>電流を抑制すると、Na<sup>+</sup>電流の減少が認められた。以上よりMBKはNa<sup>+</sup>電流を抑制し、濃度依存性にK<sup>+</sup>電流の上昇をもたらすと考えられた。

- 3) Acetoacetic acid(AA)の影響：20mMのAAにより活動電位の振幅は低下した。膜電流は外向きは変化がなく内向きが減少した。AAはNa<sup>+</sup>電流を抑制し、K<sup>+</sup>の拡散を低下させると考えられた。
- 4) 3-hydroxy butyric acid(HBA)の影響：20mM HBAで活動電位の振幅は低下し、膜電流は外向きが上昇した。Na<sup>+</sup>電流をblockすると、K<sup>+</sup>電流が増大した。4-aminopyridine(4AP)でK<sup>+</sup>電流をblockするとNa<sup>+</sup>channelのinactivationの速度が上昇し、Na<sup>+</sup>電流は抑制された。

この検討により糖尿病性神経障害における神経伝導速度の低下に血中脂肪酸、ケトン体の上昇が関与している可能性が示唆される。今後、これらの長期効果について検討を加えたい。

### 3. 神経線維の電気活動に及ぼす抗GM1抗体の影響

- 1) 神経細胞外に高GM1抗体を加えた場合、抗体濃度依存性に神経ランヴィエ絞輪部のK<sup>+</sup>電流及びK<sup>+</sup>コンダクタンスは増加した。一方、この抗GM1抗体により惹起されたK<sup>+</sup>電流の上昇は4APで抑制された。
- 2) また抗GM1抗体は活性化した補体の存在下で濃度依存性に活動電位及びNa電流の減少と、K<sup>+</sup>電流の上昇を引き起こし、高濃度下では著明なleak currentの増大を惹起させた。補体を加熱して失活した状態では、補体添加の効果はみられなかった。
- 3) これらのイオン電流の変化は家兎で感作して作成した抗H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase抗体では起こらず、抗GM1抗体に特異的であった。

傍ランヴィエ絞輪部には4AP sensitiveなK<sup>+</sup>チャンネルが豊富に存在することが報告されていることを考慮すると、GM1抗体は傍絞輪部の脱髄を起こし、そのためK<sup>+</sup>チャンネルが露出して、K<sup>+</sup>電流が増大した可能性がある。一方、同抗体は補体と共同してNa<sup>+</sup>チャンネルをブロックすると共にK<sup>+</sup>電流を増加させたが、抗体の濃度が高くなるにつれて、leak電流の上昇がみられたことより、最終的に軸索膜の高度な障害が惹起されたと考えられる。これらの成績から抗GM1抗体はランヴィエ絞輪部のイオンチャンネルに影響を与え、神経伝導速度の低下や形態学的な異常を惹起させる可能性のあることが明らかとなった。