

研 究

未熟及び成熟ラット脊髄後根神経節細胞の ATP 刺激に対する
細胞内カルシウムイオン濃度変動の画像解析

鍋島 謙一

岩手医科大学歯学部歯科麻酔学講座

(主任：城 茂治 教授)

(受付：2004年12月2日)

(受理：2004年12月14日)

Abstract : Because adenosine triphosphate (ATP) plays a pivotal role in causing inflammatory processes and pain, effects of ATP on dorsal root ganglion (DRG) has been extensively studied by electrophysiological methods. However, in the previous studies, satellite cells surrounding ganglion cells have not been studied. The present study aimed to reveal the effects of ATP on ganglion and satellite cells, to this end we observed intracellular Ca^{2+} ion concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) change in DRG which kept structural integrities. DRG were taken out from immature (E20D) and mature (8 W) rats. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes during ATP stimulation were analysed by a confocal microscope. In immature and mature DRG, both ganglion and satellite cells responded to ATP. The ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase of ganglion cells was rapid, and the decline was slow, while the satellite cell responses were spike-like. Only 1-3% of ganglion cells showed ATP-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes, and about 40% of satellite cells responded. Based on the dependence of the response on presence of extracellular Ca^{2+} and the agonist stimulations, ganglion and satellite cells possessed P2X and/or P2Y. There were no significant differences on ganglion cell responses between immature and mature DRG. In immature satellite cells, the response was single-shot, while mature satellite cells showed oscillatory fluctuation. Present results indicate that population of ganglion cells responding to ATP was low. Previous studies might confuse responses of satellite cells and those of ganglion cells. Oscillatory fluctuations appeared in mature satellite cells indicated a change of intracellular signalling mechanism during postnatal development.

Key Word : DRG, Satellite cell, Ganglion cell, P2 receptor, Calcium

緒 言

アデノシン三リン酸 (ATP) は、細胞内のエネルギー源であると同時に、自律神経末端から

放出される神経伝達物質として働いている¹⁾。加えて組織損傷時には、細胞外に逸脱した ATP が炎症や痛覚を引き起こすと考えられている²⁾。臨床的に、炎症や痛みを抑えることは

Imaging analysis of effect of ATP on intracellular calcium ion dynamics of dorsal root ganglia in immature and mature rats

Kenichi NABESHIMA

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

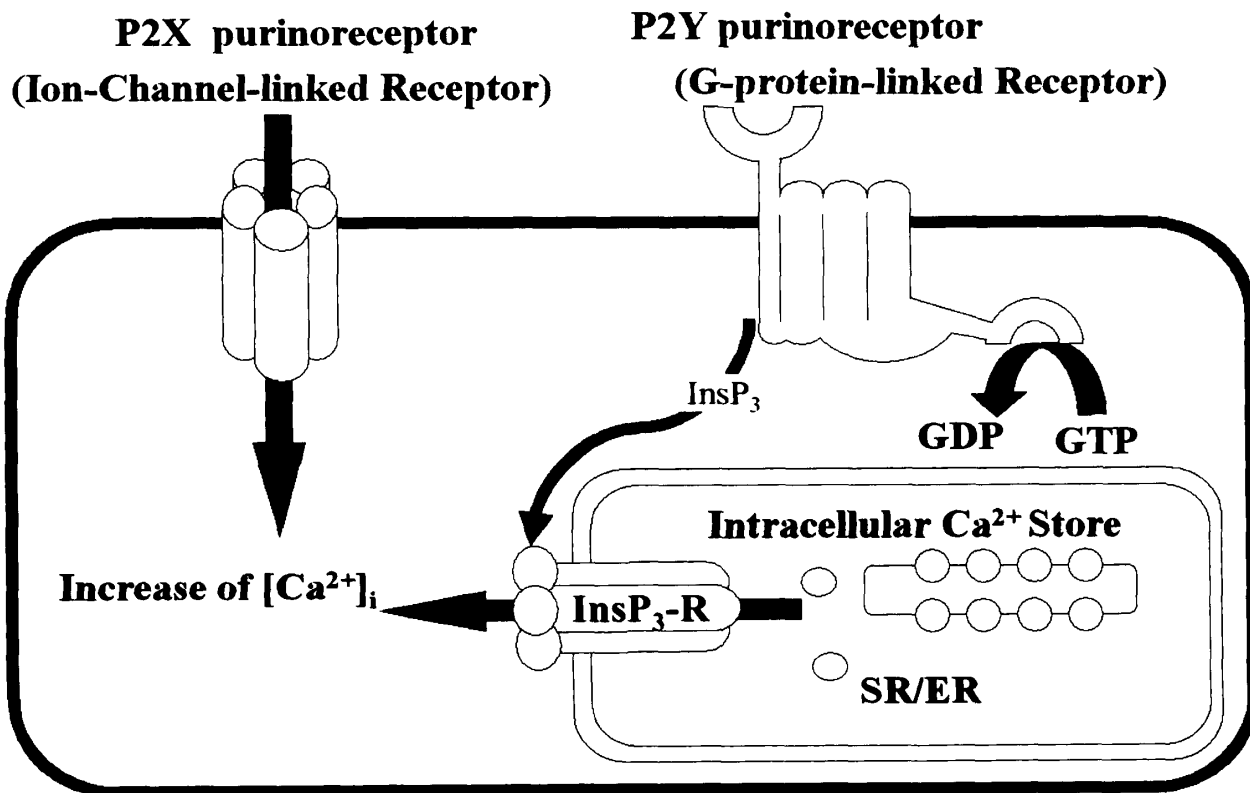


Fig. 1. Schema of P2 purinoreceptors.

P2X receptors are concerned in influx of Ca^{2+} from extracellular space, and P2Y receptors are coupled with G-proteins which causes Ca^{2+} mobilization from intracellular Ca^{2+} store.

非常に重要であり、各種細胞のATPに対する反応性を検討することは、痛みを抑えて有効な治療を考える上で意義が大きいといえる。

細胞外ATPに対して反応するプリン受容体は、P1とP2受容体に大別される。P1受容体はATPの分解産物であるアデノシンに反応するものであり、厳密に言えば、ATPそのものに対するプリン受容体はP2受容体である。P2受容体はさらに、イオンチャネル型のP2XとGタンパク質共役型のP2Yの2種に別けられる¹⁾。ATPでP2X受容体が刺激されると細胞外からの Ca^{2+} 流入が生じ、P2Y受容体が刺激されるとGタンパク質が賦活化されて、イノシトール三リン酸(InsP_3)が産生され、次いで小胞体などの細胞内カルシウム貯蔵庫から Ca^{2+} の放出・動員を引き起こすことが知られている (Fig. 1)³⁾。

これまで、免疫組織化学、電気生理学、あるいは分子生物学など種々の方法で、多くの細胞

がP2受容体を有していることが知られてきた¹⁾。痛みを感知する知覚神経細胞でも、P2XあるいはP2Y受容体が存在するという報告がなされてきたが、その結果は一定していなかった⁴⁻⁸⁾。これまでの生理学的研究や、カルシウムイメージングの仕事の殆どが、単離細胞標本でなされてきたが、実際の生体内においては神経細胞の周りを衛星細胞が取り囲んでいる。こうした神経系の支持細胞もATPに対する反応性を有している可能性がある。異種細胞の反応性の相違を明らかにする際は、組織本来の形態を維持していることが必須要件となる⁹⁾。

最近、熊谷らは組織形態を保ったままの上頸神経節でカルシウムイメージングに成功し、ATP刺激でまず衛星細胞で細胞内カルシウムイオン濃度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)が上昇し、次いで神経節細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が上昇することを報告した¹⁰⁾。さらに、神経節細胞はP2Y受容体を、衛星細胞はP2X受容体を有していることが明らかと

なった。

そこで本研究では、熊谷らに準じて¹⁰⁾組織形態をできるだけ保った標本を作製して、知覚性の神経細胞体を含む後根神経節 (DRG) の神経節細胞と衛星細胞が、ATP に対してどのような反応を示すか検討した。また、ATP によって引き起こされる反応が細胞外カルシウムの存在に依存しているかどうかを調べ、合わせて P2 X 受容体や P2 Y 受容体のアゴニストで刺激して、P2 受容体のサブタイプを検討した。DRG は生後発育の過程で形態と機能を変容させることから^{11, 12)}、出生直前の未熟ラットと成熟ラットの DRG の反応性を比較検討した。

材 料 と 方 法

実験には生後 8 週齢 SD 系成熟雄性ラット (体重 240~260g) と胎齢 20 日の出生直前の SD 系ラット (体重 4~6g) を用いた。成熟ラットを炭酸ガス吸入で安楽死させた後、実体顕微鏡下で脊柱管を開いて DRG を摘出した。また、炭酸ガスで安楽死させた妊娠ラットから胎仔を子宮ごとに取り出し、断頭した後に DRG の摘出を行った。

取り出した DRG は HEPES-Buffered Ringer 液 (HR) に湛漬し、実体顕微鏡下で結合組織を除去した。HR は、118mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.13mM MgCl₂, 1.0 mM NaH₂ PO₄, 5.5mM glucose, 0.2% bovine serum albumin (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO., USA) と minimal Eagle's medium essential amino acids solution (Flow Laboratories, Irvine, UK) 2.0mM L-glutamine, 10mM HEPES から成っており、最終的に 4 M の NaOH で pH7.4 に調整した。純化コラゲナーゼ (300 U / ml ; Elastin Product, Owensville MO., USA) で結合組織を消化した後、Ca²⁺ 感受性色素の Indo-1 /AM (10 μ M ; Dojindo, Kumamoto, Japan) を DRG に負荷した。一般的に、蛍光色素の負荷は、神経節細胞に比べて衛星細胞で良好であったが、この負荷状態に差がありすぎると、両細

胞からの蛍光信号強度が不足あるいは過飽和となり、同時解析が不可能となった。そこで色素の負荷条件 (温度と時間) をいろいろ変え、同時イメージングが可能な条件を決めた。成熟ラット DRG では 37°C で 1 時間、未熟ラット DRG では 30 分間の処理で、両細胞に色素が良好に負荷された。また、取り出した一部の DRG から、スライス標本 (VT-1000, Reichert, Austria にて 100 μ m 厚) と単離細胞標本も作製した。

標本をカバーガラスに Cell Tak (Collaborative Biomedical, Bedford, MA., USA) で固着した後、Sykus-Moore 灌流チェンバーに移送し、周囲を HR で灌流した。HR 中の Ca²⁺ を抜いて更に EGTA を 0.1mM 加えたものを、細胞外 Ca²⁺ 除去液として用いた。また刺激薬として ATP (10 μ M), α , β -methylene ATP (α , β -MeATP, 10 μ M ; P2 X₁, P2 X₃ アゴニスト), ウリジン三リン酸 (UTP, 10 μ M ; P2 Y₂, P2 Y₄, P2 Y₆ アゴニスト), および細胞膜の脱分極を引き起こす High K⁺ (56mM) を用いた。

[Ca²⁺]_i 変動は、リアルタイム高速共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Nikon RCM / Ab, Tokyo, Japan) を用いて解析した。[Ca²⁺]_i は、蛍光波長 440nm 以上と 440nm 以下の蛍光画像をもとにした Ratiometry で相対値として求めた。この場合、比が高ければ [Ca²⁺]_i が高く、低ければ [Ca²⁺]_i は低値となる。空間的解析は二次元画像で行い、暖色ほど [Ca²⁺]_i が高値で、寒色は低値を示すような擬似カラーで表示した (Fig. 2a ; カラーバー)。レーザーの連続照射は光毒性を引き起こし、蛍光色素の褪色も激しいことから、1 秒間隔で間欠的に画像取得をおこなったが、この間隔で末梢神経組織における [Ca²⁺]_i の大まかな変動を見逃すことはなかった¹⁰⁾。

一視野中の細胞数に占める反応細胞の割合を、神経節細胞と衛星細胞のそれぞれについて算出し、各観察例で得られた値をもとに、未熟及び成熟ラット DRG における反応細胞の割合

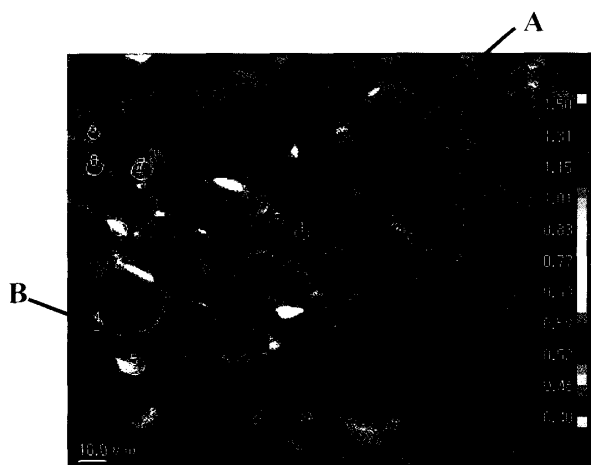


Fig. 2 a. Pseudocolor image of DRG of immature rat. Ganglion (A) and satellite cells (B) are shown. Note, size of ganglion cells is almost same.

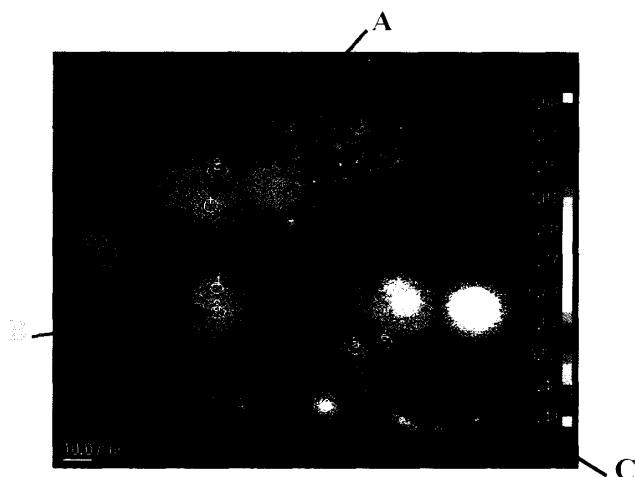


Fig. 3 a. Pseudocolor image of DRG of mature rat. Ganglion cells (A, B) and satellite cells (C) are shown. Note, sizes of ganglion cells are different.

を平均値±標準偏差で表した。

結 果

1. 蛍光画像

結合組織を消化しただけで、本来の組織形態かつ維持された標本では、類円形の神経節細胞と、その周囲を取り囲む扁平な衛星細胞が明瞭に区別できた (Fig. 2 a, 3 a)。刺激をしていない状態では、神経節細胞と衛星細胞の $[Ca^{2+}]_i$ は低く保たれ、自発的な変動は観察されなかった。スライス標本でも両者は区別できたが、切断された細胞は損傷が甚だしく、 $[Ca^{2+}]_i$ がはじめから高い状態で、しかも Indo-1 の負荷が不良であった。単離した神経節細胞は、衛星細胞の覆いを失っているものと、保たれているものが混在しており、侵害された細胞も多く、常に一定の状態の標本を得ることは困難であった。したがって、今回は、結合組織を消化しただけの標本を用いて行った。

未熟ラットの DRG では、神経節細胞の大きさはほぼ一定で、直径は $15\text{--}20\mu\text{m}$ であった (Fig. 2 a)。成熟ラットになると DRG の神経節細胞はその大きさを増し、直径が $20\mu\text{m}$ のものから $40\mu\text{m}$ のものまで、様々な大きさの神経節細胞が混在していた。衛星細胞は細胞核を含む細胞体 (長径 $3\text{--}5\mu\text{m}$ の楕円形) と神経節細胞を取り囲

む扁平な突起からなるが、未熟ラットと成熟ラットの DRG の間に、レーザー顕微鏡観察で認められるような形態的な差は無かった (Fig. 3 a)。

2. ATP によって引き起こされる変動

成熟および未成熟ラットの DRG のいずれにおいても、細胞外 ATP を灌流液に加えると、一部の神経節細胞と多くの衛星細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 変動をみとめた (Fig. 2 b, 3 b)。衛星細胞の反応が神経節細胞の反応に先行するが多かったが、時には神経節細胞が衛星細胞より先に反応することもあった (Fig. 4, 7)。

ATP に対して反応する神経節細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動は、急激な上昇とそれに続くゆっくりとした減少からなっていた。この神経節細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動パターンは、未成熟ラットと成熟ラットとで差が認められなかった。DRG 中で ATP に対して反応する神経節細胞は少なく、未成熟ラットでは、反応細胞は $0.48 \pm 1.41\%$ (平均±標準偏差, 実験例数 $n_1 = 3$, 総観察細胞数 $n_2 = 19$)、成熟ラットでは $3.06 \pm 8.94\%$ ($n_1 = 3$, $n_2 = 16$) の細胞であった。なお、ATP に対して反応しない細胞でも脱分極で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がおきたことから (Fig. 4, 5, 6), $[Ca^{2+}]_i$ 変動機構になんらかの異常があったため反応がおきな

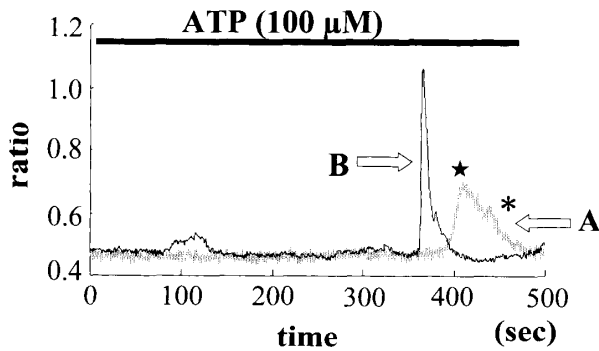


Fig. 2 b. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during ATP ($100 \mu M$) stimulation. ATP induced spike-like increase of $[Ca^{2+}]_i$ in satellite cells (marked B, solid-line) and then $[Ca^{2+}]_i$ increases in ganglion cells (marked A, dotted-line) are observed. Increases of $[Ca^{2+}]_i$ in ganglion cells are rapid (★), and the declines are gradual (*).

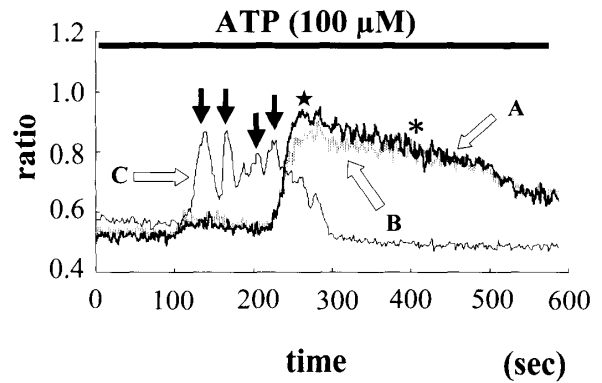


Fig. 3 b. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during ATP ($100 \mu M$) stimulation. ATP induced oscillatory fluctuation of $[Ca^{2+}]_i$ in satellite cells (marked C, solid-line). Ganglion cell response to ATP (marked A and B, dotted-lines) are consisted with first rapid increase (★) and following gradual decline (*).

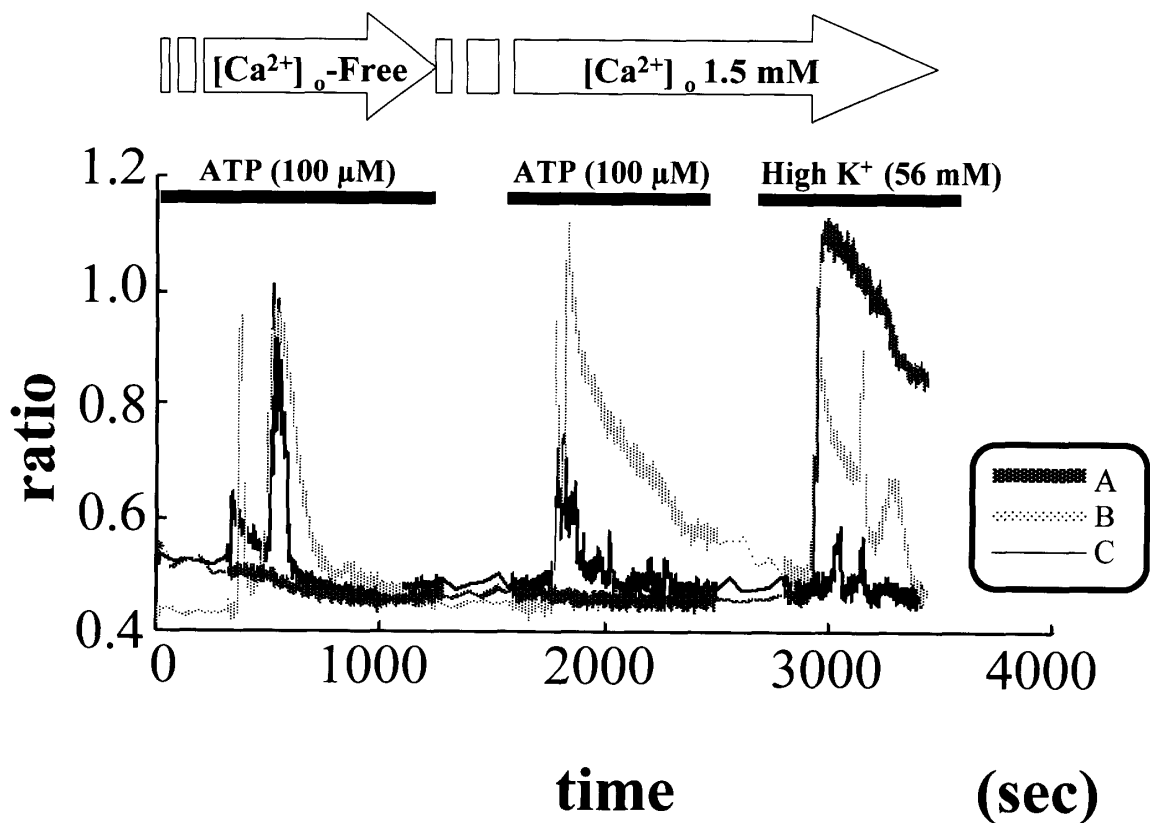


Fig. 4. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during ATP ($100 \mu M$) stimulation with or without extracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_o$) in immature rat. Ganglion cell (marked B, dotted-line) respond to ATP without extracellular Ca^{2+} . Many ganglion cells show no response to ATP (marked A, dense dotted-line). Some satellite cells respond to ATP without extracellular Ca^{2+} (marked C, solid-line). Membrane depolarization by high K^+ , as positive control of response of excitatory cells, induces $[Ca^{2+}]_i$ increase in ganglion cells.

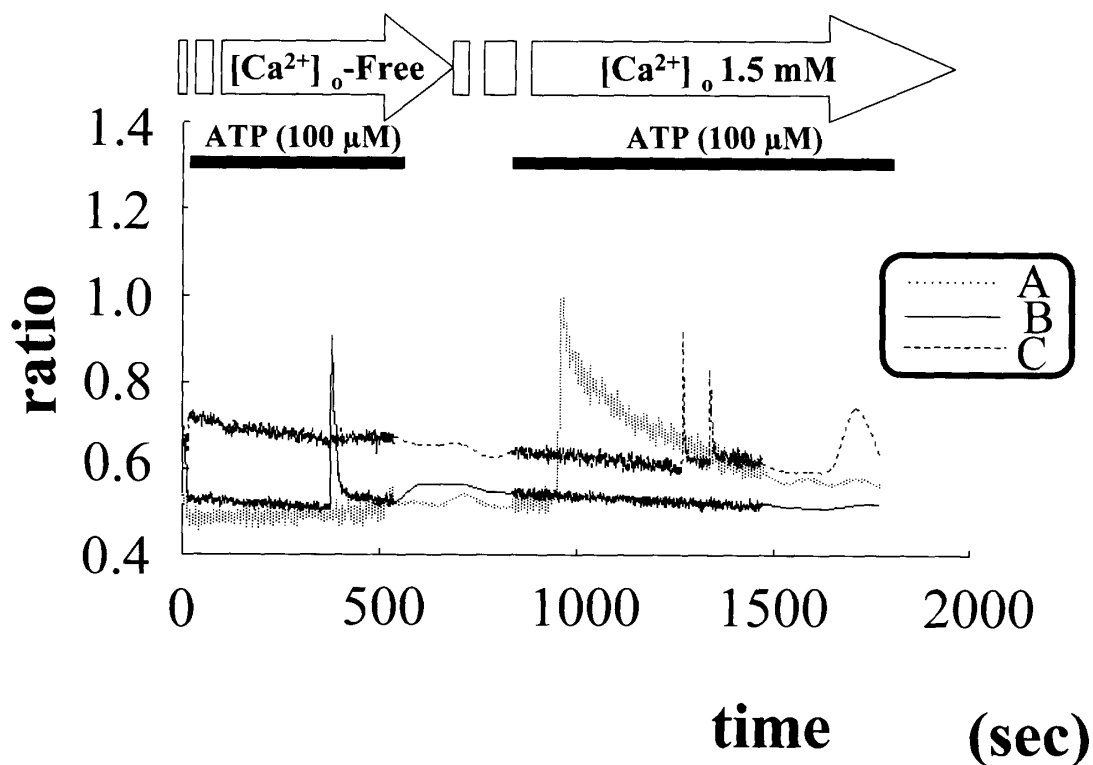


Fig. 7. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during ATP ($100 \mu M$) stimulation with or without extracellular Ca^{2+} in mature rat. Ganglion cell (marked A, dotted-line) and a satellite cell (marked B, solid-line) show no response to ATP without extracellular Ca^{2+} , but another satellite cell responds (marked C, thin-dotted-line).

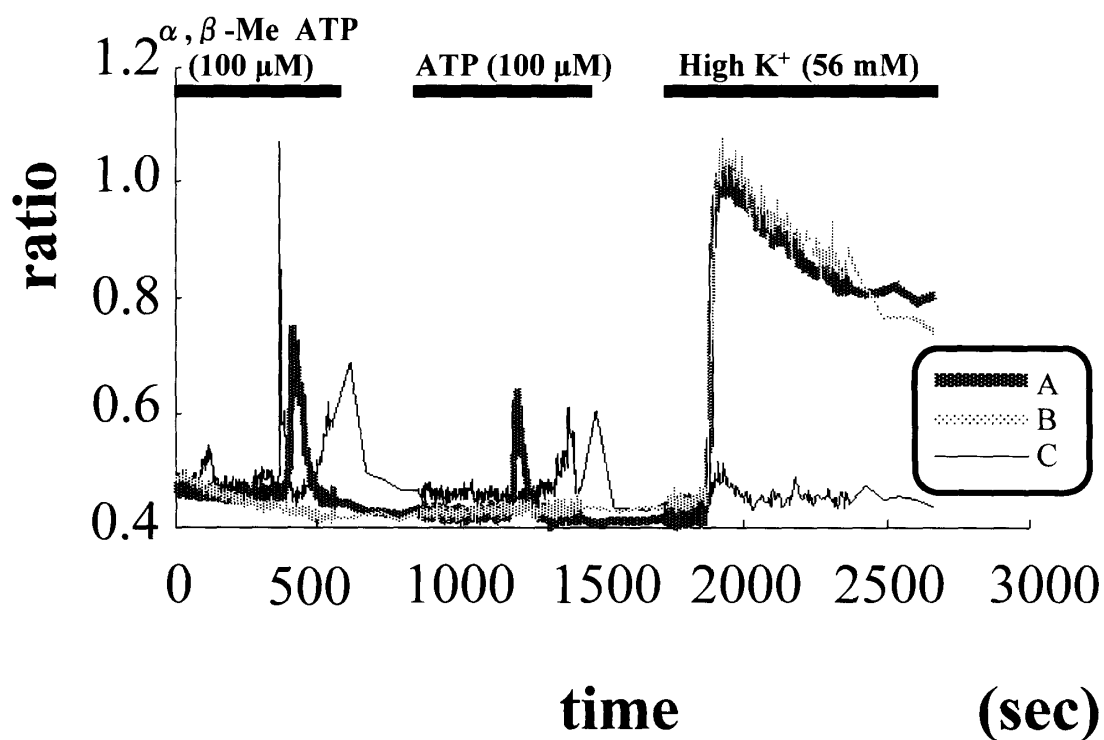


Fig. 5. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during α, β -Methylene ATP ($100 \mu M$) and ATP ($100 \mu M$) stimulation in immature rat. A satellite cell (marked C, solid-line) and ganglion cell (marked A, dense dotted-line) respond to α, β -Me ATP. Most of ganglion cells show no responds to ATP (marked B, dotted-line).

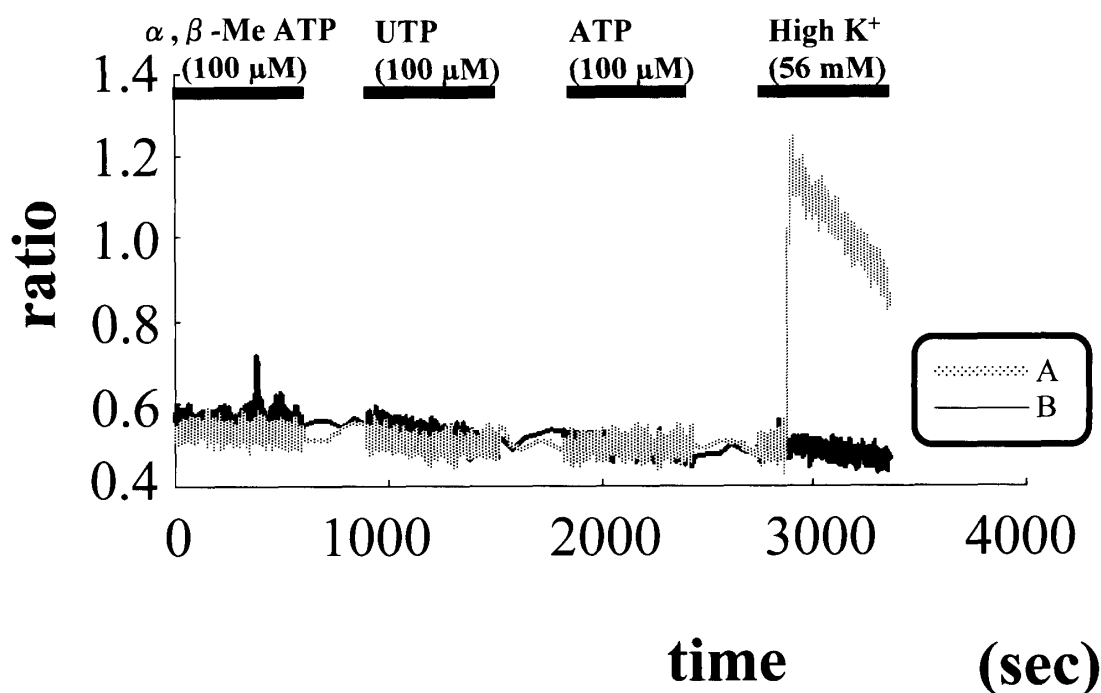


Fig. 6. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during UTP ($100 \mu M$), α, β -Me ATP ($100 \mu M$) and ATP ($100 \mu M$) stimulation in immature rat. A satellite cell respond to α, β -Me ATP ($100 \mu M$), but the cell shows no response to ATP (marked B, solid-line), suggesting desensitization. In this case, ganglion cells show no response to P2X and P2Y receptor stimulation (marked A, dotted-line).

かったわけではないと判断した。本実験では、一視野中に占める神経節細胞数が少なく、実験例数も少なかったため、反応する細胞の割合に関して未成熟と成熟 DRG 間に統計的有意差を検証するに至らなかった。

一方、かなりの数の衛星細胞が ATP に対して $[Ca^{2+}]_i$ 変動を生じた。未熟ラットでは $40.16 \pm 14.89\%$ ($n_1 = 3, n_2 = 49$), 成熟ラットでも $42.8 \pm 19.65\%$ ($n_1 = 3, n_2 = 42$) の細胞が反応した。衛星細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 変動は、神経節細胞の変動に比べて、上昇も減少の度合いも急峻であり、スパイク状を呈することが多かった。この ATP に対する反応は、未熟ラットでは単発性であったが (Fig. 2 a), 成熟ラットではスパイク状の変動が律動的に繰返される現象がしばしば観察された (Fig. 3 b, 10)。

3. 未熟ラット DRG のプリン受容体サブタイプ

ATP による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が細胞外 Ca^{2+} に依存するかどうか調べたところ、一部の神経節

細胞は灌流液から Ca^{2+} を抜いても ATP に対して反応した (Fig. 4)。このことは、ATP 刺激で細胞内カルシウム貯蔵場からの Ca^{2+} 放出・動員が起きていることを意味し、これらの細胞が P2Y 受容体を有している可能性が示唆された。けれども、P2X 受容体アゴニストである α, β -MeATP で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した神経節細胞もあり、この場合は P2X 受容体が機能していると思われた (Fig. 5)。

衛星細胞の ATP に対する反応は、細胞外 Ca^{2+} に非依存性の細胞がある一方 (Fig. 4), α, β -MeATP にも反応するものもあることから (Fig. 5, 6), P2X あるいは P2Y 受容体の存在が考えられた。なお衛星細胞では、一度反応した細胞が、次の刺激に対して応答しないという不応答現象がしばしば認められた (Fig. 6)。これは受容体の脱感作が生じたためと思われた。

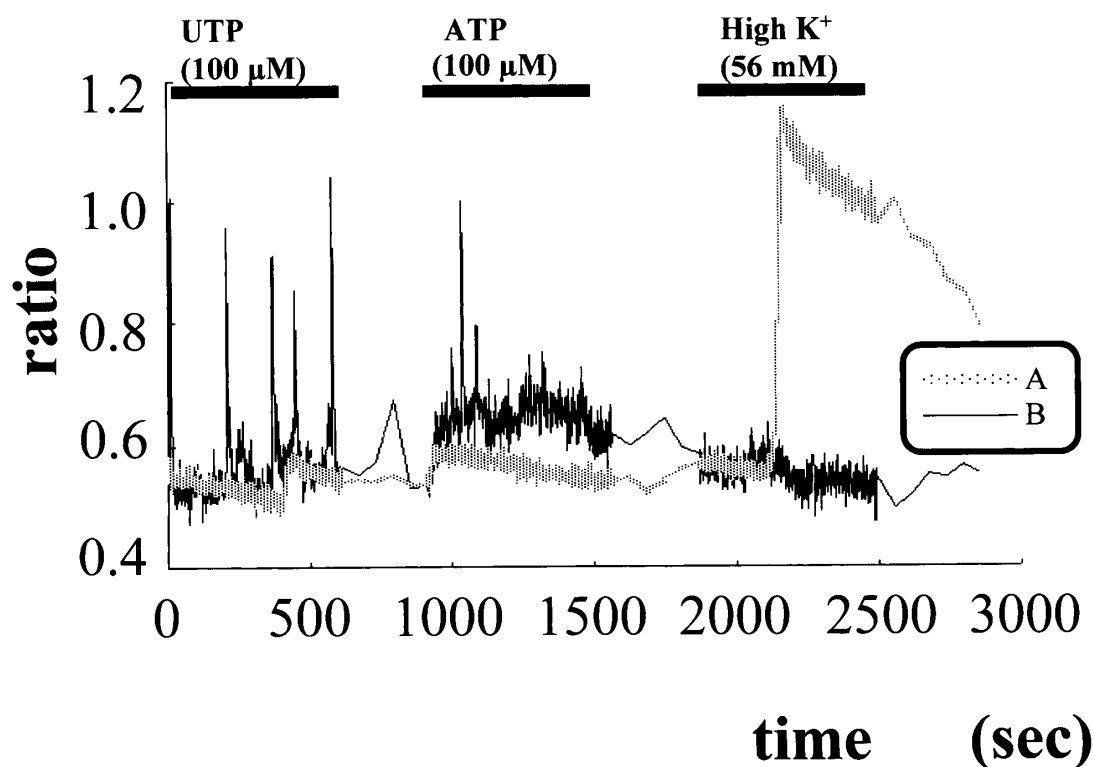


Fig. 10. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during UTP (100 μ M) and ATP (100 μ M) stimulation in mature rat. Note the oscillatory fluctuation in $[Ca^{2+}]_i$ changes is induced by UTP and ATP in satellite cell (marked B, solid-line). In this case, ganglion cell shows no response to P2 purinoceptors stimulations (marked A, dotted-line).

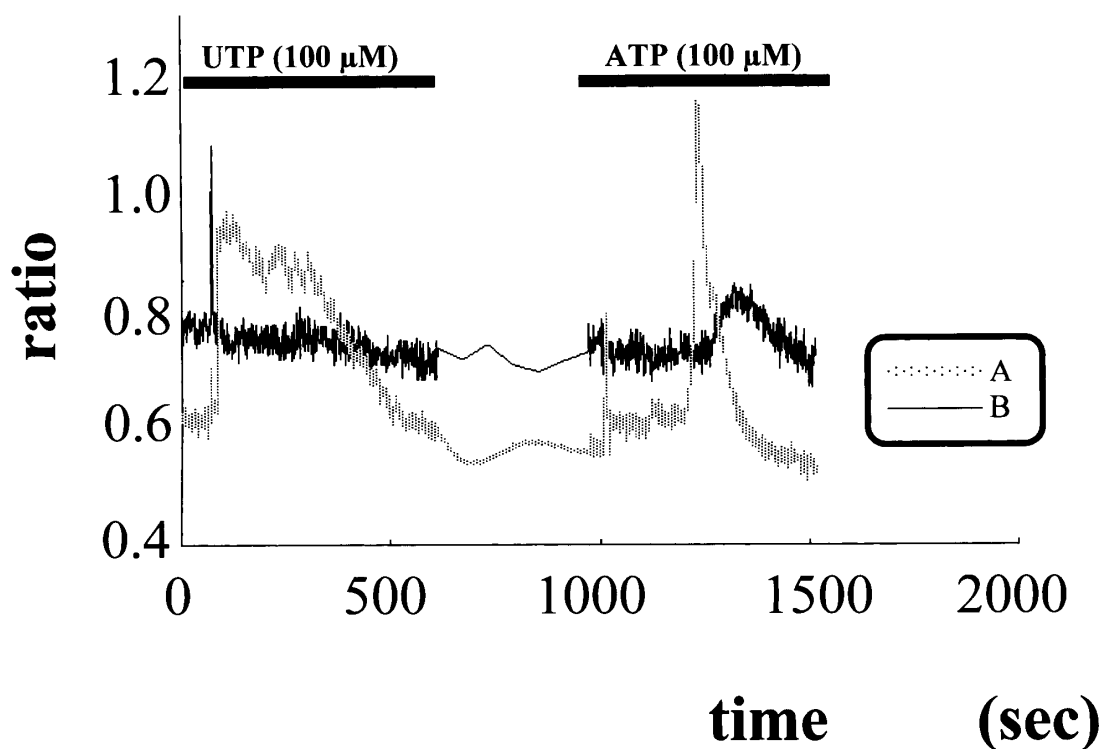


Fig. 8. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during UTP (100 μ M) and ATP (100 μ M) stimulation in immature rat. A ganglion cell (marked A, dotted-line) and a satellite cell (marked B, solid-line) respond to UTP. The satellite cell lacks the response to following ATP, suggesting desensitization.

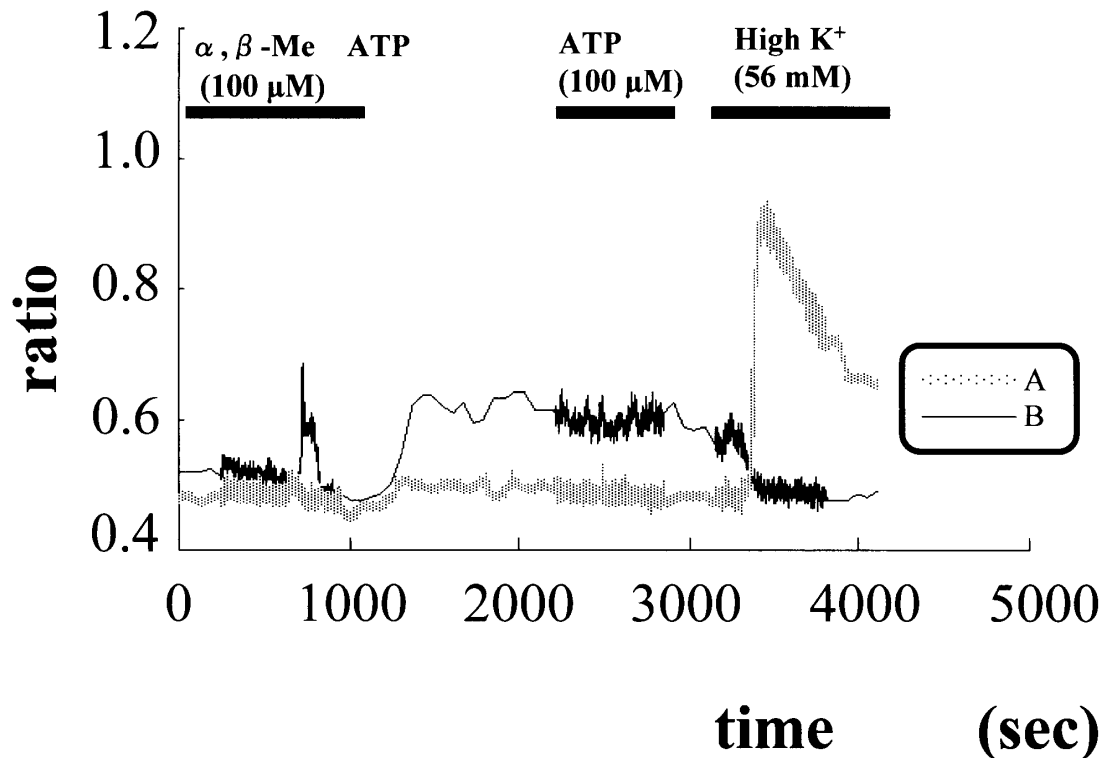


Fig. 9. Time course of $[Ca^{2+}]_i$ changes during α, β -Me ATP ($100 \mu M$) and ATP ($100 \mu M$) stimulation in mature rat. Satellite cell respond to α, β -Me ATP (marked B, solid-line), but not a ganglion cell (marked A, dotted-line). The satellite cell shows no response to ATP.

4. 成熟ラット DRG のプリン受容体サブタイプ

神経節細胞の ATP に対する反応が、細胞外 Ca^{2+} の存在に依存している場合、この反応は P2X 受容体を介する細胞外からの Ca^{2+} 流入によって起きたものと推測される (Fig. 7)。しかしながら、P2Y 受容体アゴニストの UTP に対して反応する神経節細胞もあり (Fig. 8)、成熟ラットでも神経節細胞は P2X あるいは P2Y 受容体が機能していると思われた。

衛星細胞の ATP に対する反応は、細胞外 Ca^{2+} の存在に依存する場合と非依存性の場合があり (Fig. 7)、 α, β -MeATP あるいは UTP に反応することから (Fig. 9, 10)、衛星細胞でも P2X か P2Y 受容体のいずれかが機能していると思われた。未熟ラットの場合と同様に、衛星細胞で受容体の脱感作と思われる不応答現象が観察された (Fig. 7-9)。

考 察

本研究では、できるだけ正常構造を保った DRG の標本を作製して、神経節細胞と衛星細胞を分別して $[Ca^{2+}]_i$ 動態を検討した。今回の実験では、未熟ラットと成熟ラットともに ATP に対して、 $[Ca^{2+}]_i$ が変動する神経節細胞の割合はおよそ 1~3% で、決して多いとはいえなかった。反応した細胞は P2X あるいは P2Y 受容体が機能していると考えられた。一方、ATP に対して反応する衛星細胞はおよそ 40% に上り、その受容体はやはり、P2X あるいは P2Y 受容体と思われた。

これまで、DRG の神経節細胞は P2X や P2Y を有すると言われてきたにもかかわらず⁴⁻⁸⁾、今回の実験では神経節細胞の多くが反応しなかった。その理由のひとつに衛星細胞が神経細胞全体を覆っていることが考えられる。衛星細胞がバリアとして働き、ATP が到達しにくいということがあったかもしれない。しか

しながら、ATPを高濃度(10^{-2} M)にしてみても、反応する神経節細胞の割合は増加しなかった。予備試験で行った単離神経節細胞の実験でも、反応する細胞は少なかった。未熟な状態のDRGはその覆いが不完全といわれている¹¹⁾が、反応する神経節細胞はむしろ少なかった。以上の結果から、P2受容体が機能しているDRGの神経節細胞は、これまで考えられているほど多くないと思われた。また、仮にP2受容体を有しているとしても、必ずしも機能しているとは限らないかもしれない。なお、今回の実験では、P2X、P2Y受容体の一つの細胞に同時に存在しているか、それとも別個に存在しているかどうかは判定できなかった。

標本作製過程で、受容体の脱感作が生じた可能性も否定できない。今回の標本は組織形態を保ったものとはいえ、DRGを取り出す際には組織を損傷しており、侵害を受けた細胞から逸脱した高濃度のATPがDRGの細胞を強く刺激したと考えられる。その影響で神経節細胞のプリン受容体が脱感作状態になったかもしれない。予備実験で行ったスライス標本では、ATPによる反応が殆ど観察できなかったが、これも切断された細胞から逸脱した高濃度のATPが脱感作を引き起こしたものと解釈できる。熊谷⁹⁾らの行った上頸神経節細胞の実験では、脱感作がはっきりしなかったが、DRGでは衛星細胞にも脱感作と思われる現象が見られたことから、DRGの細胞はおしなべてATPに対する脱感作がおきやすいとのかもしれない。いずれにしろ、ATPに対して反応するDRGの神経節細胞がどのくらいの割合か、今後は生体内で観察する必要がある。

衛星細胞の有するプリン受容体の意義については、まだよくわかっていない。Corsetti¹²⁾らは、長期にわたりラットにエタノールを投与した結果、形態学的変化は神経節細胞と比較すると、衛星細胞の方がより著明であることを報告した。これは、衛星細胞が有害刺激から神経細胞を守るバリアとして働いていることを示唆している。ATPは障害時に出てくる物質の一つ

であり、神経節細胞を取り囲む衛星細胞がDRG近傍の組織損傷時にプリン受容体を介して何らかの機能を果たしていると考えられる。

今回の実験では、発育段階が未熟な状態と成熟した状態のDRGの $[Ca^{2+}]_i$ 変動パターンを比較した。未熟ラットでは殆どの神経節細胞が一樣に小型であったのに対し、成熟ラットでは様々の大きさに分化していたが、ATPに対する反応性に関して、未熟と成熟動物の間に有意な差は認められなかった。生後発育において形態のみならず機能が変化するにもかかわらず¹³⁾、ATPに対する反応性が同じだったのは、実験前の予想に反する結果であった。詳細はいまのところ不明であるが、ATPに対する反応性は、出生前に既に確立していた可能性もある。今後、発生の各段階でDRGの反応性を比較検討することにより、この推測を検証できるものと思われる。

一方、衛星細胞では、未熟ラットの反応が一過性であったのに対し、成熟ラットでは律動的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動が観察された。これは、生後の成熟発達段階において衛星細胞ではATPに対する $[Ca^{2+}]_i$ 変動機構が変化している事を示している。 $[Ca^{2+}]_i$ の律動的変動にInsP3が関与していると言われていることから³⁾、生後発育の過程で、衛星細胞のカルシウム貯蔵場からの Ca^{2+} 放出・動員機構も変化していくのであろう。この衛星細胞の律動的な $[Ca^{2+}]_i$ 変動は、神経節細胞へも何らかの影響を与えているものと思われる。中枢神経ではグリア細胞と神経細胞の相互関係¹⁴⁻¹⁶⁾が報告されているが、末梢神経でもそうした関係があることは容易に想像できる。今後はこの相関関係を詳細に調べることが大事になってくるとと思われる。

ま と め

本実験ではできるだけ正常構造を保ったラットDRG標本作製し、神経節細胞と衛星細胞を分別して $[Ca^{2+}]_i$ の検討をした結果、神経節細胞だけでなく、多くの衛星細胞においてもP2受容体が機能していることがわかった。

未熟ラットと成熟ラットを比較すると、未熟ラットでは見られなかった衛星細胞の律動的な $[Ca^{2+}]_i$ の変動が成熟ラットでは認められたことから、個体が成熟するにつれて、衛星細胞のカルシウム貯蔵庫からの Ca^{2+} 放出・動員機構の変化が示唆された。

謝 辞

この稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な指導、校閲を賜りました城茂治教授に深甚なる誠意を捧げます。本研究の遂行にあたり、数多くのご指導、ご教授を賜りました医学部解剖学第二講座佐藤洋一教授、斎野朝幸博士に衷心より謝意を捧げます。さらに、本研究に際し、ご懇篤な校閲を賜りました口腔生理学講座北田泰之教授ならびに口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授に心からの感謝の意を表します。

なお、本論文の一部は第32回日本歯科麻酔学会総会（2004年10月、東京）において発表した。

文 献

- 1) Burnstock, G. : P2 purinoceptors historical perspective and classification. *Ciba Found. Symp.* 198 : 1-34, 1996
- 2) Ding, Y., Cesare, P., Drew, L., Nikitaki, D., and Wood, J.N. : ATP, P2 X receptors and pain pathways. *J. Auton. Nerv. Syst.* 81 : 289-294, 2000
- 3) Berridge, M.J. : Unlocking the Secrets of Cell Signaling. *Ann. Rev. Physiol.* 67 : (on-line published), 2004
- 4) Norenberg, W., Illes, P. : Neuronal P2 X receptors localisation and functional properties. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 362 : 324-339, 2000
- 5) Piper, A. S., Docherty, J. : One-way cross-desensitization between P2 X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurons. *J. Physiol.* 523 : 685-696, 2000
- 6) Xu, G. Y., Huang, L. Y. : Peripheral inflammation sensitizes P2 X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *The J. Neurosci.* 22 : 93-102, 2002
- 7) Tsuzuki, K., Ase, A., Seguela, P., Nakatsuka, T., Wang, C. Y., She, J. X., and Gu, J. G. : TNP-ATP-resistant P2 X ionic current on the central terminals and somata of rat primary sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 89 : 3235-3242, 2003
- 8) Gerevich, Z., Borvendeg, S. J., Schroder, W., Franke, H., Wirkner, K., Norenberg, W., Furst, S., Gillen, C., and Illes, P. : Inhibition of N-type voltage-activated calcium channels in rat dorsal root ganglion by P2 Y receptors is a possible mechanism of ADP-induced analgesia. *J. Neurosci.* 28 : 797-807, 2004
- 9) Saino, T., Satoh, Y. : Application of real-time confocal laser scanning microscopy to observe living cells in tissue specimens. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*. 53 : 49-56, 2004
- 10) Kumagai, M., Saino, T. : Effects of ATP on intracellular calcium dynamics of neurons and satellite cells in rat superior cervical ganglia. *Histochem. Cell Biol.* 115 : 285-292, 2001
- 11) Pannese, E. : Electron microscopical study on the development of the satellite cell sheath in spinal ganglia. *J. Comp. Neurol.* 135(4) : 381-422, 1969
- 12) Corsetti, G., Rezzani, R., Rodella, L., and Bianchi, R. : Ultrastructural study of the alterations in spinal ganglion cells of rats chronically fed on ethanol. *Ultrastruct. Pathol.* 22 : 309-319, 1998
- 13) Fedulova, S.A., Vasilyev, D.V., and Veselovsky, N.S. : Voltage-operated potassium currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 85 : 497-508, 1998
- 14) Cornel-Bell, A.H., Frankbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. : Glutamate-induced calcium waves in cultured astrocytes. *Science* 247 : 470-473, 1990
- 15) Smith, S.J. : Do astrocytes process neuronal information? *Prog. Brain Res.* 94 : 119-136, 1992
- 16) Fam, S.R., Gallagher, C.J., Kalia, L.V., and Salter, M.W. : Differential frequency dependence of P2 Y₁- and P2 Y₂-mediated Ca^{2+} signaling in astrocytes. *J. Neurosci.* 23 : 4437-4444