

O-1. 内包出血モデルラットにおけるオリゴデンドロサイトの動態解析

○チェヒョミン, 清水健史, 石田章真, 服部篤紀, 田尻直輝, 飛田秀樹 (名古屋市立大学大学院・医学研究科・脳神経生理学)

【背景・目的】脳卒中は世界の死亡原因の第二位を占めており, 大きく脳梗塞と脳出血にわかれる。「大脳皮質運動野—内包—大脳脚—延髄錐体—脊髄」の皮質脊髄路に出血による損傷が生じると片麻痺症状が生じる。近年, 脳損傷に対するグリア細胞の研究は徐々に進んできているが, 脳出血に対するオリゴデンドロサイトの作用は未だほとんど明らかになっていない。本研究では内包出血モデルラットを用いて, オリゴデンドロサイトの変化や, その機能を検討した。

【研究方法】内包部の小出血で大きな運動機能障害を生じる内包出血モデルを作製し, モデル作製 3 日後に還流固定し, 凍結切片を作った。抗 Olig2 抗体と細胞増殖のマーカーである抗 Ki67 抗体を用いて蛍光二重染色を行い, 内包出血後のオリゴデンドロサイトの変化を検討した。

【結果・結論】免疫組織化学染色の結果, 出血部位周辺のみならず, 出血側遠隔部の大脳脚においても Ki67 陽性の増殖細胞が有意に増加していた。抗 Olig2 抗体と抗 Ki67 抗体との二重免疫染色より, 出血部近傍および大脳脚の両部位に於いてオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖が促進していることが分かった。また, ミクログリアも出血側の大脳脚部に有意に増加していた。

これらの結果から, 脳出血後, オリゴデンドロサイトは増殖・新生し, ミクログリアとともに, 内包出血時に何らかの作用をしていると考えられる。今後, 増殖促進の分子メカニズムとオリゴデンドロサイトの機能をより詳細に研究する計画である。(利益相反 なし)

O-2. グルタミン酸ナトリウム投与法の違いによる c-fos 染色性変化

○近藤佐和, 清水健史, 石田章真, 田尻直輝, 飛田秀樹 (名古屋市立大学・大学院医学研究科・脳神経生理学)

【背景】注意欠陥多動性障害モデルとして知られる高血圧自然発症ラット (SHR) の発育期に, うま味物質のグルタミン酸ナトリウム (MSG) を経口摂取させると, 攻撃性行動が減少する。この作用は腹部迷走神経遮断により消失するため, 神経性の腸脳連関の重要性が知られている。本研究では, MSG 作用のメカニズムを検証するため, MSG を経口投与またはゾンデによる胃直接投与の異なる方法によって投与し, 神経細胞活性化マーカーの一つである c-fos の発現を免疫組織学的に検討した。

【方法】成熟オス SHR を 16 時間絶食させた後, ①水を 30 分間経口摂取, ②180mM MSG 水溶液を 30 分間経口摂取, ③60mM MSG 水溶液を 3mL ゾンデ投与, の 3 群に分け, 90 分後に還流固定し, 免疫組織染色を行った。

【結果】絶食後の水経口摂取により内側前視索野 (MPA), 室傍核, 扁桃体中心核 (CeA), 視床下部腹内側部 (DMH), 青斑核 (LC), 内側腕傍核, 孤束核 (NTS) で c-fos 陽性細胞が観測された。MSG 経口摂取では MPA, CeA, DMH, LC, NTS において c-fos 陽性細胞の染色性が增強していることが確認された。特に前頭連合皮質 (FrA) および線条体では MSG 群にのみ陽性細胞が見られた。しかし, ゾンデによる胃への直接投与群では, 経口投与群に比べて c-fos 染色性が弱いことが分かった。

【結論】MSG によって攻撃性や情動に関与する領域が活性化することが確認された。しかし, 胃への MSG 直接投与による c-fos 発現は非常に弱く, 上部消化管から脳への影響は舌受容体から脳への影響に比べ, その作用は弱い可能性が考えられた。(利益相反 なし)

O-3. 神経保護因子エリスロポエチンはミクログリアの過剰な活性化を抑制する

○鳥内皐暉¹, 田村哲也², 垣田博樹³, 岩城壮一郎¹, 朝霧成孝¹, 浅井清文², 青山峰芳¹ (¹名古屋市立大学・薬学部, ²同 医学部・分子神経生物学, ³愛知医科大学・新生児集中治療部門)

造血ホルモンとして知られるエリスロポエチン (EPO) は低酸素刺激により誘導され, 神経保護因子としても作用する。EPO 受容体 (EPOR) はミクログリアにおいても発現しているが, ミクログリアの活性化に対する EPO の効果は不明瞭である。本研究では, リポ多糖 (LPS) によるミクログリア活性化に対する EPO の作用を明らかにすることを目的とした。ラット大脳皮質初代培養細胞を用いて EPOR の発現解析を行ったところ, ニューロンやアストロサイトと比較してミクログリアにおいて発現が高いことが明らかになった。続いて, ミクログリア細胞株である BV-2 細胞に EPO 存在下と非存在下で LPS 刺激を行ったところ, EPO 存在下では発現ピーク時に炎症性サイトカインや iNOS の発現が抑制された。さらに蛍光ビーズに対するファゴサイトーシス活性も抑制された。次にマウスに EPO と LPS とを腹腔内投与し, 大脳皮質における遺伝子発現を解析したところ, EPO 併用群において大脳皮質での炎症性サイトカインの産生が抑制された。また大脳皮質におけるミクログリアの形態変化も抑制されることが明らかとなった。以上の結果から EPO は LPS によって惹起されるミクログリアの過剰な活性化を抑制することが示唆された。多

くの神経系疾患においてミクログリアの異常な活性化が報告されており、ミクログリア活性化制御機構についての理解が求められている。本研究で得られた知見が新規治療法開発の基礎となることが期待される。(利益相反 なし)

O-4. CXCR4⁺CD45⁺細胞は破骨細胞形成に重要な微小環境を構成し、破骨細胞を巨大化させる

○大塚勇斗¹, 後藤 洋², 関谷健夫², 岩城壮一郎¹, 朝霧成孝¹, 宮澤 健², 後藤滋己², 浅井清文³, 青山峰芳¹
(¹名古屋市立大学・薬学部・病態解析学, ²愛知学院大学・歯学部・歯科矯正学, ³名古屋市立大学・医学部・分子神経生物学)

骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の骨リモデリングによって常に新たな骨が形成されている。このバランスが破骨細胞優位に傾くと骨粗しょう症をはじめとする骨破壊疾患の原因となる。破骨細胞分化には、骨芽細胞で発現する RANKL から破骨前駆細胞で発現する RANK への RANKL/RANK シグナルが重要であるが、その他の破骨細胞分化に重要な微小環境については不明瞭な点が多い。そこでフローサイトメーターを用いて破骨細胞形成に重要な微小環境を構成する細胞集団について検討した。

SDF-1 の受容体である CXCR4 を発現する間葉系細胞 CXCR4⁺CD45⁺細胞に注目した。マウス骨髄細胞から CXCR4⁺CD45⁺細胞を除いた細胞群を RANKL と M-CSF 存在下で培養すると、破骨細胞の巨大化が抑制された。RT-PCR で遺伝子発現を解析すると、CXCR4⁺CD45⁺細胞は RANKL と RANK の発現が低く、RANKL/RANK シグナルには直接的に関与しないことが確認された。さらに CXCR4⁺CD45⁺細胞は SDF-1, CXCL7, CX3CL1 といったケモカインの発現が高いことが判明した。これらのケモカインの中和抗体をそれぞれ添加してマウス骨髄細胞を RANKL と M-CSF 存在下で培養したところ、破骨細胞形成が抑制された。

CXCR4⁺CD45⁺細胞は SDF-1, CXCL7, CX3CL1 を発現し、これらのケモカインの受容体をもつ細胞に作用することで、破骨細胞形成に重要な微小環境を構成することが推測された。CXCR4⁺CD45⁺細胞の機能を制御することは、骨粗しょう症をはじめとする骨破壊疾患の新たな治療法の開発に貢献できる可能性を示唆した。(利益相反 なし)

O-5. アディポネクチンと酸化 LDL の相互拮抗作用の検討

○垣野明美, 沢村達也 (信州大学・医学部・生理学)

アディポネクチンは抗動脈硬化作用をもつが、そのメカニズムは必ずしも明らかにはなっていない。このような中、

我々は、アディポネクチンが酸化 LDL に直接結合し、酸化 LDL-LOX-1 結合を阻害することで内皮障害に対して抑制的に働くことを見出した。

一方、最近、アディポネクチン受容体 T-cadherin をノックアウトした動脈硬化モデルマウスの実験で、T-cadherin が動脈硬化進行を抑制することが明らかにされた。そこで、この系にアディポネクチン-酸化 LDL がどのように影響するかを検討した。

T-cadherin を発現させた培養細胞に、アディポネクチンと酸化 LDL を反応させると、酸化 LDL がアディポネクチンを介して T-cadherin に結合することがわかった。また、酸化 LDL-LOX-1 による細胞応答に対するアディポネクチンの阻害効果は、T-cadherin を発現させることにより増強した。以上のことから、アディポネクチン-酸化 LDL 複合体が T-cadherin に結合することにより、LOX-1 を介した酸化 LDL 作用を抑制することが示唆された。

このようにアディポネクチンが酸化 LDL に対して阻害的に働くことがわかってきたが、競合するのであれば、その逆もありうるのではないかと考えた。

アディポネクチンは受容体 AdipoR を活性化し、AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) を活性化する。そこで、この反応に対する酸化 LDL の影響について、培養血管内皮細胞と AdipoR1 発現細胞を用いて検討した。これらの細胞で、アディポネクチン添加により AMPK リン酸化が亢進し、この反応は酸化 LDL によって抑制された。

以上より、アディポネクチンと酸化 LDL は互いに競合的に作用していることが示唆された。(利益相反 なし)

O-6. 背側縫線核セロトニン作動性ニューロンにおけるオレキシン誘発性の発火後過分極増強と内向き電流への細胞内外カルシウムの影響

○石橋 賢^{1,2}, N.E. Molina², 福田敦夫¹, C.S. Leonard²
(¹浜松医科大学・医学部・神経生理学, ²New York Medical College・Department of Physiology)

本研究は、多くの脳機能調節に関与する背側縫線核 (DR) のセロトニン作動性 (5-HT) ニューロンに対するオレキシンの作用を検討した。これまでに我々は、オレキシンが発火後過分極を増強 (oeAHP) するため発火頻度順応を大きくし発火様式を変化させることを報告した (Ishibashi et al., 2016)。この oeAHP の Ca²⁺ 依存性についてさらなる検討をしたところ、細胞外カルシウム ([Ca²⁺]_o) によってオレキシン誘発性の陽イオン電流 (I_{ox}) と Apamin 非感受性の oeAHP (ai-oeAHP) の両方が変調されることを発見した。両電流ともに 10mM [Ca²⁺]_o でほぼ阻害され、0.5mM で最大となり、IC₅₀ が 1.7mM (I_{oxA}) と 1.9mM (ai-oeAHP) で

あった。最大 ai-oeAHP 電流は、 I_{0x} のおよそ半分の大きさで、その比率は $>1\text{mM } [\text{Ca}^{2+}]_o$ で保たれていた。これらの結果は、ai-oeAHP 電流が細胞内外両方の Ca^{2+} によって抑制される陽イオンチャネル群に起因するということを示唆する。また、 $[\text{Ca}^{2+}]_o$ の正常なレベルでの増加が睡眠を促進することが報告されていることから、覚醒を促進するオレキシンの作用を減弱することの生理学的な関連性が考えられる。これらの発見は、高カルシウム血症の病態生理と関連があり、眠気や鬱病の臨床的兆候の一因となる可能性がある。(利益相反 なし)

O-7. Development of chemogenetic model to study physiological roles of the GABAergic projection from arcuate nucleus to the CRH nerve terminals

○R. Yesmin, M. Watanabe, A. Fukuda (Department of Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine)

Corticotropin-releasing hormone (CRH) plays a key role in the endocrine stress response. We have previously reported that the steady-state release of CRH at the axon terminals of CRH neurons in median eminence (ME) is mediated by excitatory GABAergic input from arcuate nucleus (ARC). In ARC, the Agouti-related peptide (AgRP) neuron is GABAergic and related with energy homeostasis and feeding behavior. In the current study, we aimed to investigate physiological roles of AgRP neuronal projection to the axon terminals of CRH neurons in ME. We generated AgRP cre:: DREADD transgenic mice in which AgRP neurons were selectively activated by i.p. administration of clozapine-N-oxide (CNO). We also measured corticosterone level by radioimmunoassay and c-fos expression was immunohistochemically confirmed. Upon CNO i.p. injection, c-fos expression was detected in AgRP neurons in ARC, endorsing selective activation of ARC AgRP neurons by CNO i.p. administration. Serum corticosterone level was also increased by CNO. Increases in corticosterone and c-fos expression in AgRP neurons in ARC by CNO indicate that selective activation of ARC AgRP neurons directly projecting to CRH nerve terminals in ME is successful. (COI none)

O-8. Alterations of GABAergic Neuron-Associated Extracellular Matrix and Synaptic Responses in Gad1-Heterozygous Mice Subjected to Prenatal Stress

○A.S. Sinha¹, T. Wang¹, H. Mutoh¹, T. Akita¹, Y.

Yanagawa², A. Fukuda¹ (¹Department of Neurophysiology, Hamamatsu University School of Medicine, ²Department of Genetic and Behavioral Neuroscience, Gunma University Graduate School of Medicine)

Mutations to GABA synthesizing enzyme glutamate decarboxylase (GAD) 67 and environmental insults such as prenatal stress (PS) are risk factors associated with a spectrum of psychiatric disorders. Incidentally, findings from human studies corroborate the essentiality of the dysfunction of GABAergic network and specifically a deficit in the PV-positive interneuron mediated inhibition in the medial prefrontal cortex (mPFC). In this study using a GAD67-GFP knock-in mice (GAD67^{+/GFP}) subjected to PS from embryonic day 15.0 to 17.5, we investigated the impact of this double hit on GABAergic synapses and associated extracellular matrix components. In addition to the loss of PV-positive interneurons in the mPFC reported earlier (Uchida et al., 2014), reduction in PNN densities and decrease in the glycosylation of α -Dystroglycan, a key component of dystrophin glycoprotein complex (DGC) critical to maintenance of inhibitory synapses were observed. Electrophysiological analysis indicated lower stimulus threshold intensity and increased amplitude of evoked inhibitory post-synaptic currents (eIPSCs) with prolonged decay rates in layer V pyramidal neurons in the mPFC of GAD67^{+/GFP} mice subjected to PS. Spontaneous IPSC amplitude, frequency and decay tau were altered. Miniature IPSC analysis indicated a reduction in frequency of events. Evaluation of extrasynaptic GABA_A receptor mediated current showed increased inhibitory tone. EEG analysis revealed reduction in power spectral density of gamma oscillations. Together these results suggest a critical role of gene-environment interaction in our mouse model affecting the GABAergic inhibitory network. (COI none)

O-9. GABAergic inhibition finely adjusts the output of low-frequency neurons in avian cochlear nucleus

○M. AL-Yaari, R. Yamada, H. Kuba (Dept. Cell Physiol., Grad. Sch. Med, Nagoya Univ.)

Avian cochlear nucleus, nucleus magnocellularis (NM), receives excitatory inputs from auditory nerve fiber (ANF) and conveys temporal information of sound bilaterally to the coincident detector neurons of nucleus laminaris (NL) for sound localization. Fine adjustment of EPSP size to an appropriate level is crucial for accurate coinci-

dent detection in NL, which depends on the NM activity. NM receives feedback inhibition from superior olivary nucleus which is also controlled by ANFs and large amount of inhibitory terminals are observed particularly around neurons with low-tuning frequency (low-CF neurons). However, how the inhibition regulates the output of low-CF neurons is still elusive. To address this, we made thick slice preparation (2.5mm), where the whole circuit to NM was preserved, and synaptic responses were recorded from low-CF neurons with ANF stimulation. Whole-cell recording revealed that IPSC appeared at a similar level with EPSC threshold and increased gradually with the increase of EPSC for a wide range of intensity. We evaluated contribution of inhibition to the firing of NM neurons in cell-attached recording and found that the GABA_A receptor blocker increased the firing probabilities from the firing threshold and narrowed the dynamic range of inputs. Thus, we concluded that the inhibition finely adjusts the output of low-CF NM neurons, which may ensure the binaural computation of NL neurons for a wide range of sound intensity. (COI none)

O-10. トリ蝸牛神経核のシナプス前終末における Src kinase の機能

○古田孝行, 山田 玲, 久場博司 (名古屋大学・医学部・細胞生理学)

Src kinase は多くの神経細胞に存在し, その機能は多岐に渡る. シナプス伝達の調節に関わる事も知られており, 海馬においては, Src kinase 活性化を介した NMDA 受容体の発現増加が, 長期シナプス増強に関与する事が報告されている. しかし, Src kinase のシナプス前終末における作用は良く分かってない. 本研究では, トリ蝸牛神経核(NM)細胞を対象に, Src kinase がシナプス伝達をどのように調節しているかを調べた. 孵化後のニワトリから脳幹スライス標本を作成し, NM 細胞から聴神経刺激による EPSC を記録した. Src kinase 阻害剤 (PP2) 投与により EPSC の振幅は増加した. 一方, mEPSC の振幅は変化しないことから, PP2 投与による変化はシナプス前終末で生じる事が示唆された. さらに, 累積プロットを用いた解析から, PP2 投与によってシナプス小胞の随時放出可能プールサイズが増加する事が明らかとなった. また, 連続刺激を行うと EPSC の振幅は徐々に減少したが, この減少は PP2 で事前に処理する事で抑制された. つまり, NM では神経活動に応じて Src kinase が活性化し, 小胞プールサイズを減少させる事で神経伝達物質の放出に抑制的に作用する事が示唆さ

れた. 今後は, Src kinase の局在を調べるとともに, NM シナプスにおける Src kinase 活性の生理学的役割を検討する. (利益相反 なし)

O-11. 発育期の豊かな環境飼育が新生児低酸素虚血性白質障害モデルラットに与える影響

○服部篤紀¹, 田尻直輝¹, 上田佳朋¹, 小川紫野^{1,2}, 石田章真¹, 清水健史¹, 飛田秀樹¹ (¹名古屋市立大学・大学院医学研究科・脳神経生理学, ²同 大学院医学研究科・産科婦人科学)

【背景・目的】早産児の低酸素虚血により白質障害が生じ, 二次的な神経傷害が認められる. 発育期のリハビリテーションによる効果が期待されるが, その効果の詳細なメカニズムは明らかでない. 本研究は, 後肢を中心とする運動機能障害を示す新生児低酸素虚血性白質障害 (DWMI) モデルを用い, 生後 25 日以降の発達期に豊かな環境で DWMI モデルラットを飼育し, 成熟後の運動機能の改善に焦点を当て, 行動学および組織学的な検討を行った.

【方法】生後 3 日齢 Wistar 系雄ラットに右総頸動脈閉塞および 6% 低酸素 1 時間の処置を行い, DWMI モデルを作成した. 生後 25 日 (P25) 後に豊かな環境飼育群 (EE) と通常飼育群 (SE) の 2 群に分け 5 週間飼育した. 後肢引き戻し, 棒上歩行, はしご歩行, ロタロッドの各試験により後肢運動機能を経時的に評価した. ヘマトキシリン・エオシン染色などによる組織評価も行った.

【結果】SE 群と比べ EE 群において, P35 での後肢引き戻し, 棒上歩行, はしご歩行の有意な運動機能改善が認められた. また H-E 染色において, SE 群で認められる DWMI 側感覚運動皮質の非薄化が, EE 群では著しく軽減していた.

【結論】DWMI モデルラットに対する発育期 EE は, 早い段階から運動機能の改善および組織的变化をもたらすことが分かった. すなわち, 脳障害後の発育期リハビリテーションが形態的变化を伴って効果を示すことが確認された. (利益相反 なし)

O-12. 低酸素によるマウス活動期活動量の変化は時計遺伝子によらない様様の反応が決定している

○増渕 悟¹, 矢野多佳子¹, 小松紘司¹, 中村 渉², 太田明伸³, シバスダラン・カルナン³, 武内恒成⁴, 細川好孝³, 藤堂 剛⁵, 塩見利明⁶ (¹愛知医科大学・医学部・生理学 (旧生理学 1), ²長崎大学・歯学部・加齢口腔生理学, ³愛知医科大学・医学部・生化学, ⁴同 医学部・生物学, ⁵大阪大学・医学部・放射線基礎医学, ⁶愛知医科大学・医学部・睡眠科)

ヒトにおいて夜間睡眠時の低酸素は生理的な影響が大きい。我々はマウスにおいて明期（休息期）の低酸素暴露（Daytime hypoxia；DHx）はその後の活動期の活動量の低下と活動終了期の活動量の上昇をもたらすことを見出した。この連続する2相性の反応（serial bidirectional response；SBR）は明暗周期下において活動量が日内変動を示す時計遺伝子欠損マウス（Cry1 and Cry2 double knock-out mice；CryDKO）でもみられたが、恒常暗条件下で無周期となったCryDKOでは見られない。しかし明暗周期下から恒常暗に移行するタイミングでの明期相当の低酸素暴露により活動量は約6時間間隔で低下、上昇、低下した。この無周期マウスでの波様の活動量変化は活動周期があるマウスでのSBRに相当する。DHxにより前脳のアデノシンの低下と血中コルチコステロンの上昇がみられた。朝のカフェイン投与によりアデノシンを阻害するとSBRがみられた。一方、夕方のカフェインはDHxによるSBRを弱める作用を示した。また、糖質コルチコイドの合成阻害によりDHxによるSBRでの活動量の低下が大きくなった。これらの結果に基づき低酸素の病態生理学を考察する。（利益相反 なし）

O-13. 前庭神経核ニューロンの可塑による交感神経反射の低下

○安部 力, 山岡優佑, 森田啓之（岐阜大学・医学部・生理学）

前庭系は可塑性の非常に強い器官であり、微小重力環境や長期臥床など通常とは異なる環境・状態では前庭系の応答性が変化する。過重力や微小重力などの重力環境変化もしくは行動抑制環境に動物を曝露すると、前庭系を介する運動機能や動脈血圧応答（前庭―動脈血圧反射）の調節力が低下する。また、宇宙から地球に帰還した宇宙飛行士における起立性低血圧発症にも前庭系の可塑が関与している。しかしながら、前庭系可塑のメカニズムや、それが原因で生じるデコンディショニングの全容はいまだ不明である。本研究ではこのメカニズムを調べるために、橋・延髄領域の前庭神経核ニューロンに注目して実験を行った。ラットの左側前庭神経核領域にAAV2-CaMKIIa-hChR2（H134R）ウイルスベクターにてChR2の光受容体タンパクを発現させた。意識下で光刺激を行うと、刺激反対側への姿勢傾斜、交感神経活動の増加（ $529 \pm 71\%$ ）、動脈血圧の上昇（ $23 \pm 2\text{mmHg}$ ）がみられた。交感神経の中核である延髄吻側腹外側野に逆行性のニューロントレーサーを投与すると、前庭神経核ニューロンからの投射がみられた。このラットを過重力環境（2G）に曝露すると、5日目には交感神経活動と動脈血圧の応答性が低下した（ $120 \pm 11\%$, 6 ± 1

mmHg）。これらの結果から、過重力曝露による前庭―動脈血圧反射の応答性低下には、少なくとも前庭神経核ニューロンの可塑が関与していることがわかった。（利益相反 なし）

O-14. 心理ストレス性交感神経反応を引き起こす前頭前皮質―視床下部経路

○片岡直也, 中島啓介, 中村和弘（名古屋大学大学院・医学系研究科・統合生理学）

心理ストレスによって引き起こされる体温や脈拍の上昇は哺乳類において幅広く観察される交感神経反応であり、この心理ストレスは視床下部背内側部（DMH）から吻側延髄縫線核（rMR）への直接の神経投射を活性化し、褐色脂肪組織（BAT）熱産生や体温・脈拍の上昇を引き起こす。しかしながら、DMHのニューロンにストレス信号を伝達して活性化し、交感神経反応を駆動する上位の脳領域とその活性化メカニズムは不明である。本研究で我々は*in vivo*生理実験や光遺伝学実験、神経トレーシングを行い、社会的敗北ストレスによって腹内側前頭前皮質（vmPFC）のニューロンが活性化され、そのストレス信号をDMHへ入力することを見出した。このvmPFC-DMH経路を選択的に破壊すると、社会的敗北ストレスによるBAT熱産生や体温上昇が消失した。これらの結果から、ストレス信号はvmPFCからDMHへの興奮性神経伝達によって伝達され、それによって、DMHの下流に位置するrMRからの交感神経プレモーター出力を亢進することが示された。続いて、vmPFCにストレス信号を入力する上位の脳領域の探索を行った結果、社会的敗北ストレスを与えたラットは、梨状皮質第2層および視床室傍核などのvmPFC投射ニューロンにおいてFosの発現の増加を示した。これらの脳領域はvmPFCに心理ストレス信号を入力し、交感神経反応を惹起することが示唆される。（利益相反 なし）

O-15. Neuronal responses in cue-induced reward-seeking behaviors in the rat paraventricular nucleus

○U. Munkhzaya, C. Chinzorig, H. Nishimaru, J. Matsumoto, Y. Takamura, T. Ono, H. Nishijo（富山大学・医学薬学研究部（医学）・システム情動科学）

The paraventricular nucleus of the thalamus (PVT) is thought to be important in the control of cue-induced motivated behaviors. However, it is unknown how PVT neurons mediate predictive and incentive properties of conditioned stimuli (CSs). It has been hypothesized that predictive and incentive information is more strongly represented by neural activity during initial onset of cues (early

activity) and that just before reward delivery (late activity), respectively. In the present study, rats were trained to lick a tube protruding close to the mouth just after a CS to obtain reward (sucrose or water), while PVT neuronal activity was recorded. Each CS predicted reward or non-reward when presented alone, but predicted opposite reward contingency when they were presented together as a configural stimulus. Here we show that half of CS-responsive PVT neurons responded selectively to the CSs associated with reward (CS+-related). Furthermore, the early activity of these neurons reflected reward/non-reward contingency and were less sensitive to reward value and motivation (lick latency), while the late activity was related to reward value and motivation rather than reward/non-reward contingency. Population early and late activity of the CS+-related neurons also represented predictive and incentive information of the CSs, respectively. In addition, PVT neuronal activity was correlated to individual licking during reward acquisition. The results suggest that the PVT is involved in a series of processes from CS recognition for reward availability to motivation for reward-seeking behavior as well as hedonic reaction during ingestion of palatable solution. (COI none)

O-16. 感覚上皮帯の非典型的な動きの同定と分析

○太田 岳^{1,2}, 任 書見^{1,2}, 崔 森悦^{2,3}, 日比野 浩^{1,2}
(¹新潟大学・医学部・分子生理学, ²AMED-CREST・AMED, ³新潟大学・工学部)

蝸牛は、外界から入力した音を処理して中枢に送る器官である。有毛細胞を含有する感覚上皮帯は、音刺激により振動し、この動作を電気信号へと変換する。さらに蝸牛は、小さな音を効率よく増幅し、一方で大きな音を減弱して受容する性質を持つ。この「非線形性」の成立には、外有毛細胞の変形による上皮帯の振動の調節が深く関与する。この振幅は、時にサブナノレベルに及ぶため、微小な動きを正確に抽出する技術が不可欠である。我々は、上皮帯計測を志向したレーザー干渉計を自作した。この装置は、振幅のみならず、振動中心のずれ、すなわち「位置ずれ」を同時かつリアルタイムに捉える。本手法を、Dual Sinusoidal Phase Modulating (SPM) 法と名付けた。これを生モルモットの上皮帯計測に応用した。測定部位の至適周波数は 20k-23kHz であった。この周波数において、入力音圧に対して非線形な振幅の応答が確認された。同時に、80dB 以上の大きな音圧においてのみ、数ナノメートルの上方向への位置ずれが観測された。外有毛細胞の変形の阻害薬を蝸牛に投

与すると、振幅の非線形応答に加えて位置ずれも消失した。これは、死んだ動物とほぼ同様の実験結果であった。以上より、位置ずれが感覚上皮帯の非線形振動の調節に相関する現象であることが示唆された。(利益相反 なし)

O-17. 内耳の感覚上皮ナノ振動の 3 次元計測を志向した光干渉顕微鏡の創製

○任 書見^{1,2}, 崔 森悦^{2,3}, 太田 岳^{1,2}, 日比野 浩^{1,2}
(¹新潟大・医・分子生理, ²AMED-CREST, AMED, ³新潟大・工・電気電子)

ヒトは 0.2% の音の周波数の違いを認識でき、かつ、100 万倍もの音圧の違いを知覚できる。これらの特徴は、音刺激によってもたらされる内耳感覚上皮帯のナノ振動に由来する。感覚上皮帯は、複数の層構造、すなわち、有毛細胞層、支持細胞層、そして細胞外基質層から成る。この上皮帯の振動は、これまで in vivo で計測されてきたが、各層の同一平面における振動振幅の詳細な分布は計測されていない。したがって、聴覚の特徴に対する層内の細胞間の物理的ネットワークの寄与は、今も十分に明らかになっていない。これらを解析するために、我々は上皮帯の振動を三次元で撮影することができる断層撮影顕微鏡を開発した。この装置は、医療用技術にも応用されつつある光干渉断層撮影装置 (OCT) を基礎とする。高解像度の撮像を達成するため、光のスペクトルが広く、パワーが強いスーパーコンティニューム光源を利用した。平面と深部の分解能はそれぞれ 3.6 μ m と 1.8 μ m、計測領域は 1mm 四方である。また、ハイスピードカメラを導入することで、30kHz 程度までのナノ振動が捉えられた。生きたモルモットを用いた予備実験により、音刺激に呼応して細胞外基質層内で進行する振動を計測することができた。この振動は、動物の死後、大きく減弱した。本研究で創出した装置は、感覚上皮帯の真の動作を検出し、聴覚機能の成立の鍵となるメカニズムの抽出に寄与できると期待される。(利益相反 なし)

O-18. マウス ES 細胞由来—視床下部細胞の高純度培養法の確立

○小谷 侑¹, 須賀英隆², 山本直樹³, 金子葉子¹, 河田美穂¹, 中島 昭⁴, 長崎 弘¹ (¹藤田医科大学・医学部・生理学 I, ²名古屋大学・医学部・糖尿病・内分泌内科学, ³藤田医科大学・再生医療支援推進施設, ⁴同 医学部・生化学)

幹細胞技術の発展により、多くの脳神経系細胞の分化誘導法が確立され、基礎研究のツールとしての利用や、再生医療の開発など、多方面に研究が展開されている。これまでに我々は、マウス ES 細胞 (mESC) 由来の視床下部組織

を用いて、ペプチドニューロン発達過程の解析や、動物脳への移植方法の検討を行ってきた。しかし既存の分化誘導法では、視床下部細胞のみならず、一部に筋細胞や肝細胞など中・内胚葉系譜の分化が認められ、さらに残存する未分化細胞の増殖も観察された。特に未分化細胞の増殖は顕著であり、ニューロンの生育を阻害することや、動物に移植すると腫瘍化することなど、問題点を抱えていた。

そこで本研究では、細胞表面抗原を用いて mESC 由来の視床下部前駆細胞を精製する技術を開発した。まず発生学の知見に基づき、種々の細胞系譜に特徴的な表面抗原の発現を検討したところ、視床下部前駆細胞以外の細胞群で発現する表面抗原を複数同定した。これらを蛍光抗体で標識し、FACS により陽性細胞を除去した結果、視床下部前駆細胞の濃縮に成功した。次に、FACS に代わり磁気ビーズを用いる細胞分離法 (MACS) を適用することで、前駆細胞の回収率、生存率、増殖能が著しく改善されることを見出した。精製した前駆細胞は多様な視床下部細胞を産生し、未分化細胞の増殖も認められないことから、本法により高純度な視床下部細胞の誘導が可能となった。(利益相反 なし)

O-19. 測光電極法を用いた海馬局所電位とカルシウム動態の同時記録

○小野宗範, 大森治紀, 許 峰, 呉 祖波, 加藤伸郎
(金沢医科大学・医学部・生理学 I)

アルツハイマー病 (AD) 患者の学習機能が著しく低下していることは良く知られている。AD の学習機能障害の原因として、特に早期に可溶性のアミロイド β が引き起こす、神経活動と細胞内カルシウム動態の異常が引き金となっていることが近年示唆されている。しかし、学習機能低下をもたらす神経活動異常に関しては未知の部分が多い。本研究で我々は、早期 AD における神経活動と細胞内カルシウム動態について調べるために、6-7 か月齢の AD モデルマウス (3xTg) の背側海馬から測光電極法を用いて局所電位と集団的蛍光カルシウム信号の同時計測を行った。野生型、AD モデルマウスともに、運動時には局所電位に 6-10Hz の周期的活動であるシーク波の出現が認められるとともに、カルシウム信号の上昇が見られた。運動時のカルシウム信号は、鋭い立ち上がりを見せる運動開始時の相と、それに続く運動の速度に依存した相が観察された。また野生型、AD モデルマウスの両者において、静止時にも散発する一過的なカルシウム上昇が観察された。野生型と AD モデルマウスのカルシウム信号の時間経過を比較したところ、AD モデルマウスにおいては運動開始時および静止時のカルシウム信号上昇の立ち上がりが緩やかになって

いることが明らかとなった。カルシウム信号の上昇は集団的神経細胞活動の同期を反映していると考えられるため、AD モデルマウスの海馬内では神経活動の同期レベルが減弱していることが示唆された。(利益相反 なし)

O-20. 最尖端生体光学イメージング技術を用いた新規血管分類法と動的な血管機能の評価

○本藏直樹^{1,2}, M. Richerds², 浦野哲盟¹, L. Claesson-Welsh² (¹浜松医科大学・医学部・医生理学, ²Uppsala University・Immunology, Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory)

血管・循環器は生体の適応・応答、恒常性維持のために必須の器官であり、その機能発現の中樞を担うのが物質交換の場である微小循環である。従って微小循環において時間的に制御される物質の輸送制御機構の詳細を明らかにすることは極めて重要である。この物質交換のための血管機構を正確に理解するためには組織侵襲による出血等の人為的な現象の影響を避ける必要があり、これまで分子・細胞レベルの解像を持って真の物質交換を見極めることはほぼ不可能であった。

そこで出血およびその他侵襲が生じない、非侵襲生体光学イメージング技術を自ら確立し、これにより真の物質交換の仕組みに挑戦することが世界で初めて可能となった。その結果、物質交換は単純に濃度勾配による受動輸送により行われるのではなく、血管成長因子、免疫反応などに応じて、毛細血管中後部および細静脈でのみ物質放出が行われることが判明した。またこの物質放出が起こる領域は、タイトジャンクションの構成タンパク質クローディン 5 の発現が見られない領域でのみ生じることが判明した。さらに細かな解析により、血管種依存的な閉鎖制御機構の存在を初めて明らかにし、細動脈系およびタイトジャンクションの強度が強い毛細血管前領域において、少なくとも大きな分子の物質交換がほとんどおこなわれていないことを明らかにした。新たに独自開発したイメージ解析法である、血管種別分別・血流速度・構造変動計測法 (RVDM 法) を用いることにより、物質放出が生じた領域に局限して、血流速度の低下および血管拡張が起こることも見いだした。これらの結果は、血管の生理現象とそれに関わる分子・細胞レベルの制御機構を、細かな時空間解像で解析する手法が世界で初めて確立したことを意味し、これにより真の物質交換の解析が可能となった。(利益相反 なし)

O-21. 家族性低マグネシウム血症におけるクローディン-16 の細胞内蓄積と治療戦略

○丸中歌葉¹, 松永俊之¹, 遠藤智史¹, 古田 巧², 長谷

川 元³, 五十里 彰¹ (岐阜薬科大学・生化学, ²京都薬科大学, ³埼玉医科大学)

腎ヘンレ上行脚に発現するクローディン-16 (CLDN16) はタイトジャンクション (TJ) に分布し, 原尿から体内へマグネシウムを再吸収する。遺伝性家族性低マグネシウム血症の患者で CLDN16 の遺伝子変異が数十種類同定され, 大部分の変異体が細胞内に異常局在することが報告された。本研究では, マラリア治療薬のプリマキンを用いて, CLDN16 変異体の細胞内局在と機能に対する効果を検討した。野生型 CLDN16 は裏打ちタンパク質の ZO-1 とともに TJ に分布したが, D97S 変異体は主にエンドソームなどの細胞内オルガネラに分布した。プリマキン処理により, D97S 変異体は主に TJ に分布した。さらに, プリマキン処理で D97S 変異体発現細胞の細胞間マグネシウム輸送量が増大した。D97S と同様に第 1 細胞外ループに変異を有する R131C 変異体の局在もプリマキン処理で改善したが, 他の変異体の局在は変化しなかった。タンパク質安定性を調べたところ, プリマキン処理により D97S 変異体の分解速度が低下した。プロテアソーム阻害剤やエンドサイトーシス阻害剤の処理によって D97S 変異体の発現量が増加したことから, D97S 変異体は TJ から細胞内へエンドサイトーシスされ, プロテアソームで分解されやすいことが示唆された。タンパク質凝集マーカーの ProteoStat を用いて細胞内のタンパク質凝集量を比較したところ, D97S 変異体発現細胞の蛍光強度がプリマキンやエンドサイトーシス阻害剤処理によって低下した。このことから D97S 変異体の凝集が解消されたと示唆される。以上の結果から, プリマキンは一部の CLDN16 変異体の TJ から細胞内へのエンドサイトーシスを抑制し, 遺伝性低マグネシウム血症を改善する働きがあると示唆された。(利益相反 なし)

O-22. Two-Pore Na⁺ channel 3 にみられる長期脱分極刺激依存的な活性亢進の分子メカニズムについての解析

○下村拓史^{1,2}, 久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所・神経機能素子研究部門, ²総合研究大学院大学・生理科学専攻)

Two-Pore Na⁺ Channel (TPC) は, 電位感受性カチオンチャンネルに共通する基本単位である 6 本の膜貫通ヘリックス (S1-S6) を同一分子中に 2 つ持つ特殊な分子構造を持つ。我々は, TPC ファミリー 3 (TPC3) をツメガエル卵母細胞に発現させ二電極膜電位固定法により解析した。この系において TPC3 は, 脱分極刺激によって 10 秒以上の長い時間スケールで電流量が増大する “induction” と呼ばれる特性を示す。解析の結果, induction は TPC の電位感受性の亢進によること, また, 亢進の要因が, 卵母細胞に内在する脱分極刺激依存的フォスファターゼ活性によるあるホスホ

イノシチド (PI) 種の濃度増大であることを示唆する結果を得た。すなわちこの PI 種の結合による電位感受性の亢進が, 電流量の増大として観察されることが考えられる。また, 変異体実験から, この PI の結合領域としてドメイン I の S4-S5 リンカー周辺の正電荷残基群を同定した。加えて, 2 つのドメインの S6 ヘリックス間に存在する相互作用も PI に依存して電位感受性を調節するのに重要であることが明らかになった。TPC において電位感受性は主にドメイン 2 によって担われているとされており, PI 結合によるドメイン 1 の構造変化が S6 ヘリックス間の相互作用によりドメイン 2 に伝達されることで, PI 依存的な電位依存性の変化が実現されていると考えられる。(利益相反 なし)

O-23. 強心配糖体によるヒト肝がん細胞のグルコース取込み抑制機構

○藤井拓人, 大坪愛実, 清水貴浩, 酒井秀紀 (富山大学・医学薬学研究部 (薬学)・薬物生理学)

がん細胞は ATP 合成を解糖系に大きく依存しており, グルコース輸送体 GLUT1 が高発現することでグルコース取込みが亢進している。我々は, ナトリウムポンプ阻害剤の強心配糖体 (ouabain, oleandrin, digoxin) が, ヒト肝がん由来 HepG2 細胞の原形質膜および total lysate における GLUT1 発現レベルを濃度依存的 (20nM, 200nM, 2μM) に減少させ, 細胞内へのグルコース取込みを阻害することを見出した。強心配糖体は, HepG2 細胞の増殖に対しても同様の濃度依存性で抑制した。これらの効果は, エンドサイトーシス阻害剤 dynasore (150μM) およびリソソーム阻害剤 bafilomycin (10nM) により抑制された。また, 種々の細胞内シグナル伝達関連分子の阻害剤の効果を検討したところ, CaMKII 阻害剤 KN-93 (20μM) および細胞内 Ca²⁺キレート剤 BAPTA-AM (25μM) により, 強心配糖体による GLUT1 発現抑制効果が有意に減弱することを見出した。以上の結果より, 強心配糖体による肝がん細胞の増殖抑制効果には, Ca²⁺/CaMKII シグナルの活性化によって引き起こされる GLUT1 のエンドサイトーシスおよびリソソームでの分解, それに伴うがん細胞内へのグルコース取込みの抑制が関与することが示唆された。(利益相反 なし)

O-24. マウス褐色脂肪細胞機械刺激による細胞内 Ca²⁺濃度上昇

○早戸亮太郎 (名古屋学芸大学・管理栄養学部・解剖生理学研究室)

褐色脂肪細胞は, 熱産生を専門に行う器官である。近年の研究により, この褐色脂肪細胞がヒト成人にも発現する事が確認されており, 褐色脂肪細胞によるエネルギー消費

の亢進に着目した新しい肥満予防法の開発が期待されている。褐色脂肪細胞では、細胞質における Ca^{2+} 濃度上昇に伴い NADH 脱水素酵素が活性化することで、ミトコンドリア内膜におけるプロトン勾配が上昇し、脱共役により生じる熱産生を促進することが知られている。

今回私たちの研究により、マウス褐色脂肪細胞に機械刺激を与えた結果、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を示す事を明らかにした。この Ca^{2+} 濃度上昇はプロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤 ML-9 により抑制された。一方、PKC 活性化剤 R-59 は機械刺激による Ca^{2+} 濃度上昇を増大させた。しかし、細胞外無 Ca^{2+} 溶液、ホスホリパーゼ C 阻害剤 U-73122 は機械刺激による Ca^{2+} 濃度上昇に大きな変化を及ぼさなかった。以上の結果から、機械刺激は褐色脂肪細胞内 PKC を活性化することで、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こしていることが示唆された。

今回の結果より、機械刺激によるマウス褐色脂肪細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には PKC が深く関わっていることがわかった。機械刺激が PKC 活性を増大することで褐色脂肪細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、熱産生をより促進すると期待される。(利益相反 なし)

O-25. マウス洞房結節細胞の local Ca^{2+} release に対するミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換の関与

○竹田有加里, 竹内綾子, 松岡 達 (福井大学学術研究院医学系部門形態機能医科学講座統合生理学分野)

洞房結節細胞の自動能は、細胞膜イオンチャネルの協調作用に起因するが、家兎等の洞房結節細胞では筋小胞体リアノジン受容体からの local Ca^{2+} release (LCR) も自動能発生に関与することが提唱されている。一方、我々は心房筋由来培養細胞 (HL-1) の自動能発生には、ミトコンドリア $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換 (NCXm) が関与することを報告した。しかし、洞房結節細胞の LCR 及び自動能に対する NCXm の関与は明らかでない。そこで我々は、単離マウス洞房結節細胞の Ca^{2+} イメージングを行い、LCR 及び自動能に対する NCXm の関与を検討した。ほとんどの洞房結節細胞において LCR が観察され、 Ca^{2+} トランジェント (CT) のピークから LCR 発生までの時間 (LCR period) と CT の周期長 (CaCL) の間には、正の相関が認められた。イソプロテレノールによる β 受容体刺激では、LCR 及び CT の振幅が増加し、LCR period と CaCL は短縮した。NCXm 阻害薬 CGP-37157 は、LCR 及び CT の振幅を減少させ、LCR period と CaCL を延長した。CGP-37157 投与後のイソプロテレノール刺激では、その作用が减弱した。これらの結果から、NCXm はマウス洞房結節細胞の LCR および自動能発生に寄与すると考えられる。(利益相反 なし)

O-26. モルモット脛骨栄養動脈の神経性制御

○福田裕康, 三井 烈, 橋谷 光 (名古屋市立大学・医学部・細胞生理)

【背景】骨粗鬆症における骨代謝異常の背景には、骨循環障害が存在すると考えられる。しかし骨循環を担う栄養血管の収縮制御機構は未だ明らかではない。

【方法】血管壁追跡システム (DIAMTRAK) により、モルモット脛骨栄養血管の血管径変化を経時的に計測した。免疫組織化学染色により、栄養血管の神経支配を検討した。

【結果】経壁神経刺激による栄養血管 (外径 200-300 μm) の神経性収縮は、フェントラミン (1 μM) およびグアニチジン (10 μM) で抑制されたが、交感神経によらない収縮成分が残存した。非交感神経性収縮は、高濃度のプロプラノロール (10 μM)、5-HT₂ 受容体阻害薬であるケタンセリン (100 nM) およびカプサイシン (100 nM) により消失した。外因性セロトニンによる収縮もケタンセリンおよび高濃度プロプラノロールで抑制された。一方、非交感神経性はニトロアルギニン (10 μM)、スパンタイド (100 nM) により増強した。免疫組織化学染色により、栄養血管に沿って tyrosin hydroxylase 陽性交感神経線維、5-HT 陽性神経線維およびサブスタンス P 陽性神経線維が観察された。

【考察】脛骨栄養血管は交感神経作動性、5-HT 陽性神経の血管収縮神経支配を受けており、サブスタンス P 陽性神経による NO を介した抑制性支配を受けていることが示唆された。(利益相反 なし)

O-27. 直腸の細動脈壁細胞における自発 Ca^{2+} 上昇の同期性維持機構

○三井 烈, 橋谷 光 (名古屋市立大学大学院・医学研究科・細胞生理学)

【背景】伸展性管腔臓器の細動脈では、壁細胞 (血管平滑筋細胞およびペリサイト) 間で同期した自発 Ca^{2+} 上昇が発生するが、同期性が維持される機構は十分に理解されていない。【方法】ラット直腸粘膜下層標本を用い、Cal-520 蛍光 Ca^{2+} イメージングを行った。【結果】細動脈壁細胞の自発 Ca^{2+} 上昇は、小胞体 Ca^{2+} 放出に依存し、ギャップ結合阻害剤 (3 μM carbenoxolone)、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネル (CaCC) 阻害剤 (100 μM DIDS) および低 Cl^- 溶液 ($[\text{Cl}^-]_o = 12.4 \text{ mM}$) により細胞間同期性が阻害された。T 型および L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤により、それぞれ自発 Ca^{2+} 上昇の頻度および持続時間が低下したが同期性は維持された。電位依存性 K^+ (K_v7) チャネル (10 μM XE 991) および内向き整流性 K^+ (K_ir) チャネル (50 μM Ba²⁺) 阻害剤、高 K^+ 溶液 ($[\text{K}^+]_o = 29.7 \text{ mM}$) により、自発 Ca^{2+} 上昇の頻度が増加して同期性が失われた。【結論】動脈壁細胞では、小胞体 Ca^{2+} 放

出による CaCC 開口に伴う脱分極がギャップ結合を介して細胞間を伝わり、細胞間で同期した自発 Ca^{2+} 上昇を生ずるが、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルは同期性には関与しない。 K^{+} チャンネル (K_v7 , K_{ir}) による壁細胞の興奮性抑制は小胞体の Ca^{2+} 再充填を担保し、細胞間同期性の維持に関わると考えられた。(利益相反 なし)

O-28. ラットの下行性疼痛抑制系を介した大腸運動制御における雌雄差

○堀井和広¹, 江原優花¹, 内藤清惟¹, 中森裕之¹, 椎名貴彦¹, 志水泰武^{1,2} (¹岐阜大学大学院・連合獣医学研究科・獣医生理学研究室, ²岐阜大生命の鎖統合研究センター (G-CHAIN))

【背景・目的】我々はこれまで大腸内の痛み刺激が下行性疼痛抑制系を介して大腸運動を促進することを解明してきた。痛みの制御機構には様々な雌雄差が報告されている。そこで本研究では下行性疼痛抑制系を介した大腸運動制御にも雌雄差が存在するか検証することを目的とした。

【方法】麻酔下の雄雌ラットの大腸内にカニューレを挿入し大腸内の圧変化、および大腸から排出される液量を測定した。痛み刺激を起こす物質としてカプサイシンを大腸内に投与した。脊髄腔内にカニューレを挿入し薬剤投与を行った。

【結果】大腸内にカプサイシンを投与すると雄では大腸運動が亢進したのに対し、雌では応答がみられなかった。しかしながら雌においても GABA 受容体阻害薬を脊髄腔内に投与しておく、雄と同様にカプサイシン投与により大腸運動が促進された。雄でのカプサイシンによる応答は、脊髄へ 5-HT およびドパミン受容体阻害薬を投与しておくことで抑制された。一方、雌の GABA 阻害薬存在下でのカプサイシンによる応答は、脊髄へ 5-HT 受容体阻害薬を前投与することにより消失したが、ドパミン受容体阻害薬の前投与では抑制されなかった。

【考察】5-HT, ドパミン, GABA はすべて下行性疼痛抑制系において痛みの受容・伝達を抑制する。一方、大腸運動の制御系においては雄では 5-HT・ドパミンが促進性に働くのに対し、雌では 5-HT が促進性、GABA は抑制性に働くことで、痛みによる大腸運動応答に雌雄差が生じると考えられる。(利益相反 なし)

O-29. 親を想起する幼児の Oxytocin 濃度・EEG にみる生体反応の変化

○満倉靖恵¹, 太田英作², 逸見 将³, 小杉 亘³ (¹慶應義塾大学・理工学部・システムデザイン工学科, ²電通サイエンスジャム, ³アサヒ飲料)

本研究は幼児の飲料作製と描画の感性に対する効用を生体の反応から確認し、実施条件による差異から新たな知見の獲得を目指した。生体の反応は内分泌ホルモンであるオキシトシンと脳波を生体データとして取得し分析することで確認した。対象は保育園の 6 歳児 (年長) として以下 3 条件の生体データを収集した。

1. 飲料を作る
 - ・被験者自身が飲料を作る
 - ・研究担当者が被験者の目前で飲料を作る (コントロール)
2. 飲料を作り親に飲ませる
 - ・被験者自身が親に飲ませる飲料を作る
 - ・被験者自身が自分で飲む飲料を作る (コントロール)
3. 絵を描く
 - ・被験者自身が親の絵を描く
 - ・被験者自身が静物の絵を描く (コントロール)

上記 1 で取得した脳波から被験者自身が飲料を作る際に集中度合と達成感を伴う満足感が高まることを確認した。また 2 で取得したオキシトシン濃度から親向けの飲料を作製した際に高いオキシトシン濃度を示すことを確認した。3 では描画対象とした親と静物 (コップ) の差によりオキシトシン濃度が有意に増減しなかった。これらから飲料の作成は幼児の感性に影響を与えている可能性を見出すことが出来た。また、親のために作製することのオキシトシン濃度への関与が示唆された。(利益相反 なし)

O-30. 神経症候が心因性か器質性かの鑑別に、発汗障害の有無が一助となる

○犬飼洋子, 岩瀬 敏, 佐藤元彦 (愛知医科大学・医学部・生理学)

心因性症候の特徴とされる変動性の片側上下肢の脱力、正常域への移行が正中の感覚消失を呈したが、同側半身の発汗低下の存在により器質性と判明した症例を呈示する。16 歳の男性。15 歳時に感冒の 2 週間後、突然左下肢に脱力、異常感覚と温冷感消失、発汗低下を発症したが、ステロイドで寛解した。翌年、顔面を含む上半身左半側にも同症状を発症したが、ステロイドで寛解した。症状は月に 1~2 回増悪と寛解を繰り返し、増悪の度にステロイド点滴で寛解した。既往にアトピー性皮膚炎や喘息などのアレルギーがあり、総 IgE が高値であった。神経学的に握力は右 31/左 6kg で、左手指は完全伸展不可能。しかし徒手筋力テストで左側眼輪筋、上肢、下肢で力を入れるタイミングが変化し、Barré 徴候は陰性すなわち左上肢の落下は回内なく、途中で保ち上昇した。左大腿に装具装着でしゃがみ立ちや歩行は可能。腱反射の左上下肢の亢進は日によって変化し

た。以上の症候は心因性と考えられるが、Minor 法で温熱性発汗低下部位が境界明瞭に全身左半側に存在した。Horner 症候群はないが左眼は眩しくなかった。ステロイド 30mg/ 日内服で症候はほぼ回復した。これらのことから、器質性に病巣が存在したと考えられる。病巣は、温熱性発汗促進路・脊髄視床路・皮質性の錐体外路を含む、右側間脳～中脳と思われる。発汗障害の有無が、心因性か器質性かの鑑別の一助となる。(利益相反 なし)

P-1. Effects of Balneotherapy on Immunological Function in Patients with Cardiovascular Disease

○工藤義弘 (九州大学病院・別府病院・慢性疾患診療部)

It is well known that balneotherapy has beneficial effects for the patients with rheumatoid arthritis (RA). In addition, it has also been elucidated that managed bathing is an effective treatment for the patients with chronic inflammatory disease, malignant tumor and chronic obstructive pulmonary disease. However, the detailed effects of balneotherapy for the patients with chronic heart disease are little known. The purpose of this study is to refine the immunological effects of bathing in hot spring against the patients with chronic heart disease. These patients are treated with bathing in hot spring at 40°C everyday for two weeks, and the amount of several cytokines existed in their sera such as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and NK activity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were investigated between before and after bathing for two weeks. As a result, the amount of IL-6 significantly reduced after bathing for two weeks ($P < 0.05$) at the all patients and IL-1 β , IL-8, TNF- α and NK activity indicated the tendency to decrease after bathing for two weeks. These findings suggest that bathing in hot spring revealed the beneficial effects and improvement of immunological responses for the patients with cardiovascular disease. (COI none)

P-2. TRPV4 is functionally expressed in cultured mouse Schwann cells

○F. Xiaona^{1,2,3}, Y. Takayama^{1,2,3}, M. Tominaga^{1,2,3}
(¹Division of Cell Signaling, National Institute for Physiological Sciences (NIPS), ²Thermal Biology Group, Exploratory Research Center on Life and Living Systems (ExCELLS), ³Department of Physiological Sciences, The

Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI))

Schwann cells (SCs) are the primary glial cells in peripheral nerves system. Sensing and detecting the changes in the external microenvironment is important for retaining the SCs' phenotypic plasticity. TRP channels were reported as sensors for temperature, osmotic pressure, volume, stretch, and vibration. The TRP channels are expressed and activated throughout the body. However, there are few reports about TRP channels in SCs.

SCs were isolated from sciatic nerves (SCN) from adult mice, and physiological analyses were performed. Intracellular calcium concentrations were increased by the TRPV4 activator GSK1016790A, suggesting that TRPV4 is functionally expressed in SCs of adult mice. However, we didn't find any differences in the expression of MAG, P0, MBP proteins, which are the main myelin structure proteins, between WT and TRPV4-KO adult mice. SCN transection- or crush-induced Wallerian degeneration was evaluated by western blotting and immunostaining in WT and TRPV4-KO mice. The amount of P0 protein was larger in TRPV4-KO mice after SCN transection or crush injury. However, there was no significant difference in the expression of neurofilament (NF) and autophagosomal marker LC3-II. Increased expression of P0 protein could affect the transection or crush injury of SCN. (COI none)

P-3. 無麻酔ラットにおけるアナフィラキシー低血圧時の血漿 Angiotensin-2 濃度の変動

○芝本利重¹, T. Zhang^{1,2}, 谷田 守¹, 九田裕一¹, 倉田康孝¹ (¹金沢医科大学・医学部・生理学第二, ²中国医科大学第4病院・直腸肛門ヘルニア外科)

Angiotensin-2 (Angpt-2) は内皮細胞に貯蔵され、ヒスタミンなどの刺激で血中に放出され血管透過性を亢進する。近年、敗血症や急性呼吸促拍症候群の血管透過性亢進への関与が示唆されている。しかし、アナフィラキシーにおける血管透過性亢進への関与は不明である。本研究は無麻酔ラットのアナフィラキシー低血圧において経時的に血中 Angpt-2 濃度を血管外への血漿漏出量を反映するヘマトクリット (Hct) とともに測定した。感作ラットでは卵白アルブミン抗原投与により体血圧は 106 $\pm$ 3mmHg から6分後に 58 $\pm$ 10mmHg と最低となり、その後1時間には 94 $\pm$ 8 mmHg に回復した。Hct は 42% から投与後 20 分に最大値 55% となり、1時間、2時間後にはそれぞれ 50%, 46% に漸減し、24時間後には投与前値以下になった。Angpt-2

濃度は投与前値の $20 \pm 2 \text{ ng/ml}$ から投与後 1 時間から有意に上昇し ($27 \pm 3 \text{ ng/ml}$)、6 時間後には投与前値の 2.7 倍の $54 \pm 6 \text{ ng/ml}$ とピークとなり、24 時間後には投与前値に復した。一方、非感作ラットでは測定値に有意な変化は見られなかった。以上の結果から、Angpt-2 はラットアナフィラキシー低血圧時に増加するも、アナフィラキシーの初期の血管外体液漏出には関与しないことが示唆された。(利益相反 なし)

P-4. コレシストキニン又はレプチンの静脈内投与によるマウス消化管迷走神経求心路及び交感神経遠心路反応

○谷田 守, 芝本利重, 倉田康孝 (金沢医科大学・医学部・生理学 II 講座)

先行研究において、小腸から分泌されるコレシストキニン (CCK) や白色脂肪組織から分泌されるレプチンは摂食抑制作用があり、ラットの迷走神経求心路を活性化させる (Endocrinology 8 : 3518-25, 2005, J Physiol. 591 (7) : 1921-34, 2013)。本研究では、マウスを用いて CCK 又はレプチンによる迷走神経求心路への作用と交感神経遠心路への作用について解析を行った。

ウレタン・ α クロラロース麻酔下でマウス求心性迷走神経胃枝、肝臓枝及び腹腔枝を電気生理学的方法で計測した。CCK の静脈内投与は濃度依存的に求心性迷走神経胃枝を活性化して、肝臓枝及び腹腔枝も活性化した。また、レプチンの静脈内投与 ($100 \mu\text{g}$) も同様に求心性迷走神経胃枝、肝臓枝及び腹腔枝の神経活動を増大させた。CCK による求心性迷走神経胃枝活性化は、セロトニン受容体 (5-HT₃) 阻害剤又は TRPV1 阻害剤投与によっても残存していた。一方で、CCK 静脈内投与は、交感神経腎臓枝及び肝臓枝の活動を促進したが、褐色脂肪枝への活動には影響しなかった。

以上の結果から①マウスへの摂食抑制ホルモンは、消化管迷走神経求心路を活性化させること、②交感神経遠心路の活性化作用は臓器特異性があることがわかった。本学会では、食餌性肥満マウスへの効果についても解析したので報告する。(利益相反 なし)

P-5. 結腸筋組織のカルシウムオシレーション複合体

○高井千穂¹, 山田尚那¹, 岩田尚子¹, 金丸和典^{2,3}, 田中謙二⁴, 飯野正光^{2,3}, 中山晋介¹ (¹名古屋大学・医学部・生理学, ²東京大学・医学部・薬理学, ³日本大学・医学部・薬理学, ⁴慶応大学・医学部・精神医学)

結腸運動には、機能状況に応じて著明な収縮特性変化が要求される。内容物収容時には、持続性収縮力が内容物の接線方向の力とのつり合いが長時間にわたり維持される。一方、運搬・排泄時には、相性の速い収縮により、内容物

の推進運動をする。

この結腸運動の大きな変化の基礎となるメカニズムを探求するため、私たちは Ca 感受性タンパク (YC-Nano50) を結腸筋組織に発現するトランスジェニックマウスを使用し研究を行った。その FRET イメージング計測は、Slow と Rapid 成分によって構成される細胞内 Ca オシレーション複合体の存在を明らかにした。基底状態での緩やかな Ca 濃度の上昇変動に引き続き、速い Ca オシレーションが集積し持続的な細胞内 Ca 上昇を形成した。また、基底状態における細胞内 Ca の ~20% の上昇は、持続的 Ca 上昇ヘレスポンスする筋収縮状態を responsive モードから unresponsive モードへと移行した。これらの収縮モードは、それぞれ運搬および収容時の筋機能に好ましいと考えられた。本研究結果は、細胞内 Ca の速い上昇による相性収縮の他に、収縮モードを切り替える第二の Ca スイッチの存在を支持した。後者は、高エネルギー効率のラッチ収縮に相当するメカニズムかもしれない。(利益相反 なし)

P-6. 低体温療法が神経幹細胞の分化に与える影響について

○白川菜由¹, 鳥内卓輝¹, 垣田博樹², 岩城壮一郎¹, 朝霧成拳¹, 青山峰芳¹ (¹名古屋市立大学・薬学部・病態解析学, ²愛知医科大学・新生児集中治療部門)

本研究は、新生児の低酸素性虚血性脳症の治療法として用いられている低体温療法に関して、詳細には明らかにされていないメカニズムの解明、さらには治療法の改善に役立てることを目的としている。新生児期には神経幹細胞が多く存在するとされているため、この点に着目し、低体温療法が神経幹細胞の分化に影響を与えるか検討した。低酸素条件で培養後に低温条件で培養した神経幹細胞を分化させ、免疫細胞染色を行い形態を確認する方法と定量的 RT-PCR を行い、神経幹細胞の遺伝子発現の変化を確認した。まず、マウス由来 ES-D3 細胞を神経系細胞へ分化誘導し、浮遊培養で Neurosphere を作製し、完成後、これを①常酸素 (20%)・常温 (37.0℃)、②常酸素・低温 (33.5℃)、③低酸素 (1%)・常温、④低酸素・低温という 4 群に分け、①と②を常酸素条件、③と④を低酸素条件で各々 24 時間培養後、①と③を常温条件、②と④を低温条件で各々 72 時間培養した。その後、定量的 RT-PCR を行い、また、細胞を接着培養し分化させた後、免疫細胞染色を行った。染色や PCR に用いる抗体として、Nestin, Tubulin, GFAP などの神経系の各分化段階にそったマーカーを用いた。免疫細胞染色とリアルタイム PCR の結果、各群で細胞の形態と遺伝子発現の変化に大きな差は見られなかった。以上の結果から、低体温療法は神経幹細胞の分化に影響を与えないとい

う可能性が示された。(利益相反 なし)

P-7. 胎生期大脳基底核原基の神経前駆細胞内 Ca^{2+} シグナリングについて

○秋田天平, 福田敦夫 (浜松医科大学・医学部・神経生理学)

大脳皮質内の GABA 作動性神経細胞の多くは、胎生期では主に内側基底核原基 (MGE) で発生し、大脳皮質に移動する。その移動の誘導因子として neuregulin-1, 忌避因子として semaphorin 3A 等が知られている。また、1 型 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体 (NKCC1) の働きにより、細胞内 Cl^- 濃度が成熟神経細胞よりも高められていることから、GABA_A 受容体 Cl^- チャンネルの活性化が細胞膜脱分極をもたらし、その結果誘起された電位依存性 Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 上昇が移動を促進することも知られている。しかし、それらの誘導・忌避因子が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を促進又は制御する可能性や、それらの因子の GABA 作用への影響については不明である。最近我々は、細胞移動の盛んな胎生 14 日目のマウス胎仔 MGE より急性単離した細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ イメージングを行うことにより、上記可能性について検討を始めたので、その経過を報告する。(利益相反なし)

P-8. バルプロ酸誘発性自閉症モデルラットにおける腸内細菌叢の変化

○宮本佳菜¹, T.T.K. Soon¹, 広瀬 侑¹, 笛田由紀子², 上野 晋², 諫田泰成³, Y. Nomura⁴, 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学・工学研究科・環境生命工学, ²産業医科大学, ³国立医薬品食品衛生研究所, ⁴Queens College, the City University of New York)

自閉症の有病率は年々増加傾向にあり、社会問題化しているが、その正確なメカニズムや有効な治療法は未だ解明されていない。近年、自閉症患者は健常者と比べ胃腸症状を発症しやすいことから、脳と腸が密接に影響を及ぼしあう「脳腸相関」が関連していることがわかってきた。抗てんかん薬として知られているバルプロ酸ナトリウム (VPA) は、妊娠中に曝露することで、胎児が自閉症になるリスクが高いことが知られている。本研究では、胎生期に VPA 投与したラットにおいて、生後の小脳や海馬の構造や機能に影響が現れることを報告してきた。本研究では、VPA 投与妊娠ラットにおける腸内細菌叢の変化を調べた。VPA は、妊娠 16 日 (E16) の Wistar ラットに 600mg/kg 投与した。ラットの糞便は E7, E14, E18, E21 で採取した。試料は、QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて精製した。次いで精製した DNA を MiSeq (Illumina) を用いて 16S

rRNA 配列決定し、データを DADA2 パッケージを用いて分析した (Callahan et al, 2016)。その結果、投与前の E7 と E14 の腸内細菌叢を比較したところ、*Proteobacteria* が有意に減少した ($p=0.07$)。さらに、VPA 投与後の E18 と E21 の腸内細菌叢を比較したところ、対照群では *Bacteroidetes* が減少傾向にあるのに対し、VPA 投与ラットでは停滞傾向にあった。また対照群では *Firmicutes* が増加傾向にあるのに対し、VPA 投与群では停滞傾向にあった。このように VPA 投与後の妊娠中ラットの腸内細菌叢と対照群との間に違いがあった。今後は、VPA 投与からの回復処理における腸内細菌叢に与える影響についても観察する。(利益相反なし)

P-9. アップコンバージョンを用いたファイバーレス光遺伝学の開発

○宮崎杜夫^{1,2,3}, S. Chowdhury^{1,2,3}, 山下貴之^{1,2,3}, 松原崇紀^{1,2,3}, 湯浅英哉⁴, 八尾 寛⁵, 山中章弘^{1,2,3} (¹名古屋大学環境医学研究所神経系分野 2, ²名古屋大学医学系研究科神経性調節学, ³CREST JST, ⁴東京工業大学機能分子化学, ⁵東北大学脳機能解析)

近年、可視光を受容する光感受性タンパク質を用いる光遺伝学は、高い時間・空間精度で神経活動を調節できる手法として広く用いられている。しかし、その従来の光遺伝学に用いる可視光は組織を透過できないため、生体においては光源につながった光ファイバーを目的の脳部位へ挿入しなければならない。そのため、脳への侵襲性やファイバーによる行動制限が問題となっている。そこで、生体を透過することができる近赤外光 (NIR) を光遺伝学に適用することを考えた。NIR で活性化するタンパク質は未だ知られていないため、NIR を可視光に変換するランタニド粒子 (LMP) を脳の標的領域に注入し、NIR から間接的に光感受性タンパク質を活性化させる。本研究では、ファイバーレス光遺伝学の開発として生体における適応を行った。マウスの背側線条体 (dSTR) に CIV1 を発現させるアデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて遺伝子導入し、同領域に NIR で LMP を注入した。NIR による光刺激は、コントロール群に比べて対照群における行動量が有意に増加した。そして、dSTR にアニオンチャンネルロドプシンである ACR1 と LMP を注入したマウスを作製し、ロータロッド試験法によって運動協調性を観察したところ、対照群はコントロール群と比べて、NIR 照射により運動協調性が有意に低下した。これらの結果は、このアップコンバージョンを用いたファイバーレス光遺伝学が神経活動、並びに行動操作が可能であることを示唆している。(利益相反 なし)

P-10. GABA による抑制性伝達におけるカリウムークロライド共役担体 (KCC2) のリン酸化による機能制御の役割

○渡部美穂¹, J. Zhang², M. Mansuri³, J. Duan³, K.T. Kahle^{3,4}, 福田敦夫¹ (¹浜松医大・神経生理, ²Inst Biomed Clinical Sci, Univ Exeter Med Sch, ³Dept Neurosurgery, Yale Sch Med, ⁴Depts of Pediatrics and Cell and Mol Physiol : Centers for Mendelian Genomics, Yale Sch Med)

KCC2 は Cl⁻ を細胞外にくみ出し, 細胞内 Cl⁻ 濃度を低く保ち GABA による抑制性伝達を維持している. これまでに KCC2 はリン酸化による制御を受けており, 幼若期には KCC2 の 906 番目 (Thr⁹⁰⁶) と 1007 番目 (Thr¹⁰⁰⁷) のスレオニン残基がリン酸化されているために機能が抑制されており, 発達に伴い脱リン酸化されることにより KCC2 が機能し始め, GABA 作用が興奮性から抑制性になることを *in vitro* 実験で報告している. 本研究ではリン酸化による KCC2 機能制御の役割について個体レベルで明らかにするために, Thr⁹⁰⁶ と Thr¹⁰⁰⁷ をグルタミン酸に置換し, リン酸化状態を模倣した Kcc2^{E/E} マウスを作製し解析を行った. このマウスは体重の低下を示し, 生後 10 時間前後で死亡した. 痛覚および接触刺激によりてんかん発作が認められ, 死亡前には自発発作の頻度の増加がみられた. KCC2 の Cl⁻ くみ出し能が低下しており, 脊髓第 4 頸神経より記録される自発性の呼吸リズムがみられず, 第 2 腰神経より記録される歩行リズムが乱れていた. スパイン形成は正常に認められたが, 中隔, 視床下部, 海馬, 大脳皮質の神経分布に異常がみられた. よって, 発達期に KCC2 の Thr⁹⁰⁶ と Thr¹⁰⁰⁷ のリン酸化が適切に制御されることが, 抑制性 GABA 伝達の形成に必須であり, 神経発達および生存に重要であることが示唆された. (利益相反 なし)

P-11. 超音波顕微鏡を用いたヒト皮膚線維芽細胞の観察およびアスコルビン酸投与によるコラーゲン増加の動的可視化

○仲田しずか¹, T.T.K. Soon¹, 小林和人², 穂積直裕³, 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学・工学部・環境生命工学, ²本多電子 (株), ³豊橋技術科学大学・工学部・電気電子情報工学)

皮膚の老化において, 主要な役割の一つに, 真皮に存在する線維芽細胞の成長と増殖がある. 皮膚の弾力においてコラーゲンやエラスチンなどのタンパク質は重要であるが, それらを産生しているのが線維芽細胞である. つまり, 線維芽細胞の活性化は皮膚の老化予防に直結するといえる.

L-アスコルビン酸は, コラーゲンの増殖因子として知ら

れ, コラーゲンの三重螺旋構造の安定化に必要なヒドロキシプロリンの合成の際, 補酵素として働く. また, 弾性繊維発現の抑制剤としても確認されている. L-アスコルビンの誘導体化は分子構造の安定化などの利点がある. ビタミン C 誘導体の一つである L-アスコルビン酸ナトリウムの投与は, 生化学的試験によりコラーゲン繊維と弾性繊維両方の産生促進することが報告されている.

本研究では, 培養ヒト皮膚線維芽細胞に, ビタミン C 誘導体の 1 つである 58mg/L のリン酸-L-アスコルビン酸マグネシウム投与することによりコラーゲン発現にどのような影響があるかを, 超音波顕微鏡を用いて非侵襲的に観察した. 光学顕微鏡では細胞の表面にもやのように見えるコラーゲンが, 超音波顕微鏡では細胞周囲に粘弾性の変化として, 経時的に可視化することができた. 一方, 細胞自体には粘弾性の変化はあまり見られなかった. 今後は, 音響インピーダンス画像とアクチンとコラーゲンを免疫染色した共焦点顕微鏡の画像を合わせて, コラーゲンの存在位置を二次元的に特定する. (利益相反 なし)

P-12. 胎児期化学物質曝露ラットの脳小脳変化および行動異常

○松房利恵¹, 岩本早起¹, 笛田由紀子², 上野 晋², 関野祐子³, Y. Nomura⁴, 諫田泰成⁵, 吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学・環境・生命工学, ²産業医科大学, ³東京大学, ⁴Dept Psychol, Queens College, ⁵国立医薬品食品衛生研究所)

化学物質の胎内被曝により自閉症スペクトラム障害 (ASD) の発症リスクが増加することが報告されている. 小脳は運動機能や意思・感情を制御する器官であり, ASD 発症の中心部位であることが明らかになっている.

本研究ではこれまで胎児期にバルプロ酸 (VPA) 曝露したラットにおいて小脳や海馬の機能と構造の変化および行動を観察し, 報告してきた. 本研究ではさらに発達期神経毒性の疑いのある化学物質についてその反応を見た.

クロルピリホス (CPF) はシロアリ駆除剤として用いられる有機リン酸系殺虫剤であり, ASD 発症が疑われている. また, トリコスタチン (TSA) は ASD 発症因子と考えられている VPA と同じ HDAC 阻害剤であり, 細胞周期の乱れなどを生じさせる.

本研究では, これらの化学物質に暴露されたラットの脳小脳構造および行動を観察し, 化学物質の種類による共通点, 相違点について議論する.

胎内被曝した 18 日齢ラットの脳小脳スライスに CalbindinD-38k 染色し, プルキンエ細胞 (PC) を観察したところ, CPF, TSA 曝露の両方において PC の欠損が見ら

れた。また HE 染色し、小脳構造を観察しところ、CPF 曝露では小脳葉 VI 層の褶曲、TSA 曝露では輪郭の変形が見られた。

次に 6 週齢のラットを用いて、個別行動、社会性行動、対物行動を観察した。被曝物質によって探索行動や身繕い時間に差が生まれたが、ASD モデルという点での共通点は見られなかった。

今後は、これらのラットの小脳における分子的变化を観察し、ラットの行動に関連付け、考察する。(利益相反 なし)

P-13. 胎児期の LPS 被曝がラットの小脳に与える影響

○大塚暖子¹、諫田泰成²、吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学環境・生命工学、²国立医薬品食品衛生研究所)

妊娠中の母体へのストレスは、子どもの神経障害を引き起こす要因とされる。グラム陰性菌の外膜に存在するリポポリサッカリド (LPS) は、糖側鎖部分である O-抗原、コアオリゴ糖、リピド A から構成されており、それぞれは温和な加水分解により分解される。リピド A は、血中に侵入すると TLR4 に結合し活性化を経て IL-1 β や TNF- α などのサイトカインを放出する。これらは細菌を排除する働きを持つが、腸内細菌に含まれるリピド A がストレスにより過剰に体内に放出されると毒性を示す。胎児期の LPS 被曝は自閉症の原因の一つとされ、動物モデルの作成にも用いられてきた。本研究では従来胎児期のパルプロ酸 (VPA) 投与動物モデルを用いて神経の異常や行動の異常を観察してきた。この中で、小脳のプルキンエ細胞 (PC) が過剰に発達すること、小葉に過剰の切れ込みができることを報告している。

本研究では、E16 日で 100 μ g の LPS を被曝させた、生後 14 日齢のラットの小脳の観察を行った。Calbindin¹ 抗体染色では PC を観察したところ欠損を確認した。次に Iba1 抗体染色でミクログリアの分布を観察したところ、PC 層で集中的にミクログリアが存在していることを確認した。さらに HE 染色では、第一裂において過剰の切れ込みがあり、VPA 投与動物と類似の構造であることを確認した。

LPS 投与では、PC の減少がみられたにもかかわらず VPA と同様の過剰な切れ込みが生じたことから、神経細胞の生死と別のメカニズムがあることが示唆された。(利益相反 なし)

P-14. 環境内物質が小脳の神経回路形成に与える影響

○二神 健¹、諫田泰成²、J. Hu³、Y. Nomura⁴、吉田祥子¹ (¹豊橋技術科学大学、²国衛研、³Icahn School of Medicine at Mount Sinai、⁴Queens College, NYCU)

近年、大きな社会問題の一つとして自閉症がある。自閉症とは、社会的相互作用の欠陥、コミュニケーション障害、繰り返し行動などにより特徴付けられた発達障害である。自閉症の発症要因として、遺伝子因子に加えて特に環境因子が注目されている。その環境因子には、農薬、化学薬品、重金属、芳香などがある。

グリホサートは世界中で最も使われる除草剤であり、近年、その使用率は増加している。グリホサートは、人の腸内にあるシキミ酸経路を破壊する。シキミ酸経路は、芳香族アミノ酸複合体と関係しており、これらアミノ酸はセロトニン、ドーパミンなど全てのモノアミン神経伝達物質の前駆体である。また、葉酸欠乏やマンガン不足を誘発する。また、サリドマイドは抗多発性骨髄腫、ハンセン病の治療薬、サリドマイド胎芽病として知られているが、母体へのサリドマイド曝露はセロトニン神経系に異常をきたし自閉症を誘発するとされる。

本研究では、母体にグリホサート 250mg/kg またはサリドマイド 500mg/kg を投与し、仔の小脳内の神経発達に関係するプルキンエ細胞と、炎症に関わるミクログリア、アストロサイトを抗体染色で観察した。その結果、プルキンエ細胞の減少とミクログリアの活性化が観察された。さらに、HE 染色から、V・VI 葉が小さいことが観察された。また、グリホサート投与ラットでは P40 で行動異常、サリドマイド投与ラットでは発達異常が見られた。神経系への影響を今後詳細に観察していく。(利益相反 なし)

P-15. トリ蝸牛神経核における発達に応じたカルシウムチャネルの発現変化

○武藤健右、山田 玲、久場博司 (名古屋大学・医学部・細胞生理学)

トリの蝸牛神経核においては、カリウムチャネルの発現が孵化前後に増加することで、連続する音入力に対して高い時間精度で応答することに役立っている。このカリウムチャネルの発現変化は音入力依存的に起こることが知られており、活動に応じて流入するカルシウムイオンの関与が示唆されている。しかしながら、発達段階においてカルシウムの流入がどのように制御されているかはよくわかっていない。今回の研究では各発達段階のニワトリ蝸牛神経核から、パッチクランプ法を用いてカルシウム電流を記録することで、カルシウムチャネルの発達にともなう発現変化を調べた。カルシウムチャネルは活性化する電位の違いによって低電位活性型 (LVA) と高電位活性型 (HVA) に分類されるが、LVA チャネルは持続的な脱分極で不活性化することから、固定電位を変えることで分離して評価した。胚生期においては、LVA 電流、HVA 電流ともに発達に

伴って徐々に増加し、孵化直前で最大であった。LVA 電流は孵化後に急激に減少するが、HVA 電流はあまり変化しなかった。さらに内耳を取り除くことで孵化直後に聴覚入力を遮断した場合には、LVA 電流の減少はみられなかった。これらのことからトリ蝸牛神経核においては LVA、HVA チャネルが胚生期における神経細胞の機能成熟に関わっていると考えられる。さらに LVA チャネルの発現は聴覚入力依存的に制御されており、これは孵化後急激に増加する音入力に対してカルシウム流入量を恒常的に調節する仕組みであることが示唆された。(利益相反 なし)

P-16. Brainbow 法と組織透明化によるニワトリ脳幹聴覚神経回路の 3 次元的可視化

○関川 博, 江川 遼, 久場博司 (名古屋大学・医学部・細胞生理学)

我々動物は両耳に届く音のマイクロ秒オーダーの時間差 (ITD) を利用することで、正確に音源の位置を特定することができる。ITD の検出は、脳で音の周波数ごとの聴覚神経回路によって行われる。鳥類では、脳幹の層状核 (NL) に投射する大細胞核 (NM) の軸索の特徴的な投射と分岐のパターンが、音の周波数に応じた ITD の検出に寄与していることが知られている。しかしながら、この精緻な回路構造の形成メカニズムについては、多数の軸索構造を高精度かつ効率的に解析することが困難なため、未だ分かっていないことが多い。本研究では、Brainbow 法と組織透明化を組み合わせることで、ニワトリ胚の脳幹聴覚神経回路の全容を効率的に可視化する実験系の構築を試みた。胚齢 1.5 日のニワトリ胚に卵内エレクトロポレーションを行い、NM の神経細胞に Syn プロモーター下で三色の蛍光タンパク質をランダムに発現するコンストラクトを導入した。その後、胚齢 12, 15, 18 日で脳幹を摘出し、厚み 1.5mm のスライスを作成した後、CUBIC 法で透明化処理を施し、共焦点顕微鏡で観察した。その結果、NM 神経細胞を様々な色で標識でき、その色の違いを利用して NM から NL へ投射する個々の軸索の全長をトレーシングすることで、周波数地図に対応した投射パターンを確認できた。また、ITD 検出に寄与する遅延線回路と呼ばれる特徴的な分岐パターンも確認することができた。さらに、NM 神経細胞のみならず、髄鞘形成により伝導速度を調節して ITD 検出に寄与するオリゴデンドロサイトについても、MBP プロモーターを用いることで特異的に多色観察することができた。以上から、聴覚神経回路の 3 次元構造の可視化と遺伝子工学的な操作が可能な本実験系は、聴覚神経回路の形成メカニズム解明に向けた今後の研究に有用であると考えられる。(利益相反なし)

P-17. ニワトリ脳幹聴覚神経回路におけるオリゴデンドロサイトの 3 次元形態解析

○江川 遼, 服部展幸, 久場博司 (名古屋大学・医学部・細胞生理学)

音は左右の内耳で別々に神経活動に変換された後、脳幹の内側上オリブ核 (MSO) に同時に到達して情報が統合される。MSO は音の発生した方向に対応したマイクロ秒オーダーの両耳間時間差を検出し、ニューロンの位置として符号化している。この脳幹聴覚神経回路において、オリゴデンドロサイトは MSO に入力する軸索上のミエリンの長さを領域ごとに巧みに変化させて伝導速度を調節することで、左右からの音情報の伝導距離の違いを相殺して MSO における同時検出に寄与すると考えられている。一方で、このようなミエリン形成の領域差を生み出すメカニズムについては未だ理解が進んでいない。本研究で我々は、ヒトと可聴域の近いニワトリにおいて、哺乳類の MSO と相同な層状核 (NL) に入力する軸索上にミエリンを形成するオリゴデンドロサイトを可視化できる実験系を構築し、組織透明化によりその 3 次元形態を解析した。胚齢 1.5 日のニワトリ胚に卵内エレクトロポレーションを行い、MBP プロモーター制御下で膜移行 GFP を発現するコンストラクトをトランスポゾンにより導入した。その後胚齢 21 日で脳幹を摘出し、厚み 2mm のスライスを作成して CUBIC 法による透明化処理を行い二光子顕微鏡で撮像した。3 次元形態を解析した結果、対側投射 (Tract) 領域では NL 周辺領域に比べて個々のオリゴデンドロサイトが形成するミエリンの数が少なく、また各ミエリンの平均長が長いことが明らかとなった。本実験系は形態解析に加えて遺伝子工学的な操作・介入も容易に行えることから、オリゴデンドロサイトによる神経回路機能の調節原理を研究するうえで有用なモデルになると期待できる。(利益相反 なし)

P-18. 視床下部室傍核オキシトシンニューロンは延髄縫線核へ投射して褐色脂肪熱産生を誘導する

○福島章紘, 中村和弘 (名古屋大学・大学院医学系研究科・統合生理学)

視床下部室傍核および視索上核に起始するオキシトシン神経系は下垂体以外にも様々な脳領域へ投射する。本研究では、オキシトシンニューロン特異的に任意のレポーター遺伝子を高発現させるアデノ随伴ウイルス (Oxy-Tet virus) を用いて、交感神経系の中樞性制御におけるオキシトシンの機能を検討した。

膜移行型 GFP 遺伝子を組み込んだ Oxy-Tet-palGFP virus をラット室傍核に注入すると、交感神経プレモーターニューロンが存在する吻側延髄縫線核 (rMR) において

GFP 陽性軸索が観察された。また縫線核セロトニンニューロンにオキシトシン含有神経終末が投射していることも免疫染色法で確認された。CTb による rMR からの逆行性標識では、室傍核においてオキシトシンとの二重標識が観察されたが、視索上核では観察されなかった。また、麻酔ラットの rMR にオキシトシンを微量投与すると、褐色脂肪組織の交感神経活動の増加や頻脈が観察された。この作用は rMR へのオキシトシン受容体拮抗薬投与によって阻害さ

れた。さらに室傍核オキシトシンニューロンに光活性化陽イオンチャネル ChIEF を発現させ、rMR の軸索終末に光刺激すると同様の交感神経反応が誘導された。

以上より、室傍核オキシトシンニューロンは吻側延髄縫線核へ投射し、交感神経プレモーターニューロンを活性化することで交感神経活動を促進することが示された。(利益相反 なし)