

第53回日本生理学会中国四国地方会

会 期：平成13年（2001年）11月9日（金）
 場 所：広島大学霞キャンパス 広仁会館
 当番幹事：広島大学医学部生理学第一 瀬山一正
 参 加 者：80名

先年に引き続き、今年もe-mailを案内の主な手段とした。演題の投稿，参加申し込みはすべてe-mailで寄せられた上，抄録の校正もpdfファイルをe-mailに添付することで行った結果，郵送に比べ時間がかなり節約された。今回の発表は24演題，各12分の口演で，学部学生を含めて学生の登壇発表も多く，様々な分野において活発な質疑応答がなされた。次回の当番幹事は高知医科大学・第一生理学教室の予定。

1. 局所麻酔薬メキシレチンの各種Naチャンネルイソフォームに対する効果の比較

河越宏之¹，木下英司²，山岡 薫²，藤本吉範¹，瀬山一正²（¹広島大学・医学部・整形外科学，²生理学第一）

リドカインなど抗不整脈薬I₁に分類される局所麻酔薬は心臓のNaチャンネルに対するブロック作用が他臓器に比べ強いことが知られている。われわれは経口服用が可能なリドカインの誘導体である，メキシレチンについてやはりその臓器特異的な作用が存在するかどうかを検討するため，ラット由来のNaチャンネル α サブユニット，rH1（心臓），rBIIa（脳）， $\mu 1$ （骨格筋）についてそれぞれHEK293細胞に発現させメキシレチンのブロック作用を定量した。その結果rH1が最もメキシレチンに感受性が高いことがわかった。しかし局所麻酔薬結合部位と想定される部位でかつ心筋Naチャンネル特有のアミノ酸を有している部位のアミノ酸（rH1-V406）はその心臓特異的なブロック作用とは関係がないことがわかった。

2. Na⁺チャンネルD1, D4 S4-5間リンカーにおけるグラヤノトキシン感受性部位

前島 洋¹，木下英司²，山岡 薫²，結城常譜²，瀬山一正²（¹広島大学・医学部・保健学科，²広島大学・生理学第一）

グラヤノトキシン（GTX）は電位依存性Na⁺チャンネルに特異的に作用し，不活性化を阻害する。ラット骨格筋Na⁺チャンネル（ $\mu 1$ ）はラット心筋Na⁺チャンネル（rH1）に比べてGTX感受性が高い。また， $\mu 1$ とrH1間においてD1およびD4S4-5間リンカーの相同する単一アミノ酸の変換により，感受性が逆転することが確認されている。今回，両S4-5間リンカーのGTX結合部位について検討する

ため，両リンカーにおける各アミノ酸をAlaに置換したミュータントを作成し，パッチクランプ法によりGTX感受性を計測した。その結果，rH1のD1S4-5間リンカー部の244番LeuをAlaに置換したポイントミュータントにおいて，GTX感受性はrH1よりも著しく低下した。また， $\mu 1$ に関して，D1でのアイソフォーム間感受性逆転の責任部位におけるアミノ酸のAla置換にrH1の244番目に相同するアミノ酸のAla置換を加えたダブルミュータントにおいて，GTX感受性はrH1よりも更に低下した。以上の結果より，rH1のD1，244番目に相応するアミノ酸部位がGTXのチャンネル結合に深く関与していることが明らかとなった。

3. ラット耳下腺導管細胞のCa²⁺依存性陰イオン電流

大島一宣¹，広野 力²，杉田 誠²，岩佐佳子²，新谷英章¹，柴 芳樹²（¹広島大・歯・口腔機能修復学講座・歯科保存学第一，²基礎口腔医学講座・口腔生理学）

細胞内Ca²⁺上昇による耳下腺導管からのHCO₃⁻分泌機構を明らかにするために陰イオン電流を解析した。ラット耳下腺よりコラゲナーゼ処理で導管細胞を分離し，ホールセル記録法と比べて安定な測定が可能なアンフォテリシン穿孔パッチ法でイオン電流を測定した。電極内液をCsClとし膜電位を-80mVと+80mVの間で変化させた時のI-V curveは，Ca²⁺イオノフォアA23187で細胞内Ca²⁺濃度を上昇させると，外向き・内向きともイオン電流が増加し，弱い外向き整流性を示した。この電流の増加は外液Cl⁻濃度に依存しCl⁻チャンネル阻害剤であるDPC，NFA，IAA-94で抑制されることから，主にCa²⁺依存性のCl⁻チャンネルの開口によることが示唆された。更にグラミジジン穿孔パッチ法で電極内液をKClとし-80mVで陰イオン電流を測

定すると、A23187で誘導される陰イオン電流が炭酸脱水酵素阻害剤メタゾラミドで抑制されることから、生理的条件下での電流成分として HCO_3^- が関与している可能性が高い。

4. ポストシナプス特異的蛋白質導入法

寺田洋明, 松下正之, 李 勝天, 富澤一仁, 森脇見義, 大本堯史¹, 松井秀樹 (岡山大学大学院・医歯学総合研究科・生体制御科学専攻・細胞生理学, ¹神経病態外科学)

蛋白質導入法は7~20個のアミノ酸からなるProtein Transduction domain (PTD) と呼ばれるペプチドを蛋白質に結合させることにより、目的の蛋白質やペプチドを細胞内に導入する方法である。我々は11個のアルギニンが並んだアミノ酸配列が神経細胞へ効率よく導入されることを報告している。

本研究において、FITCをN末端に結合させたポリアルギニンとNR2BのPDZ結合ドメインを融合したペプチドを人工合成した。FITCを結合させることにより蛍光顕微鏡で観察する事が可能となり、神経細胞内でのペプチドの移動を確認できる。このペプチドは海馬培養神経細胞に添加するのみでポストシナプスに移行する事が確認された。このペプチドを用いて、生化学的、電気生理学的実験を行ったので得られた結果について報告する。

5. リーラーマウスにおける中枢神経細胞内のタウ蛋白質のリン酸化機構

満田憲昭, 大久保信孝, 前田信治 (愛媛大学・医学部・第二生理)

リーラーマウスはリーリン蛋白質の欠損マウスで、大脳皮質・小脳における層構造の形成異常を特徴とする。最近このマウスで、ヒトのアルツハイマー病と同様の中枢神経細胞内のタウ蛋白質の高度リン酸化が報告された。今回、我々は分子生物学や免疫組織化学的手法を用いて、このマウスにおけるタウ蛋白質のリン酸化機構を解析した。このマウスではタウ蛋白質上のGSK3 β によるリン酸化部位 (Thr180, Thr270), GSK3 β /Cdk5共通のリン酸化部位 (Thr8, Ser396, Ser404) がリン酸化されていた。GSK3 β 活性の増加は、GSK3 β 蛋白質量の増加によるものと考えられた。Cdk5活性も増加していたが、蛋白質量には変化がなかった。この活性の増加はCdk5のコアクティベータであるp25量の増加によるものと考えられた。またタウ蛋白質の脱リン酸化酵素であるProtein Phosphatase 2A蛋白質量の減少も見られた。以上より、リーラーマウスにおけるタウ蛋白質の高度リン酸化には、タウ蛋白質リン酸化酵素GSK3 β ・Cdk5活性の増加と脱リン酸化酵素Protein Phosphatase 2A活

性の減少が関与していると考えられた。

6. 神経型NO合成酵素のスーパーオキシド産生におけるフラビンおよびオキシゲナーゼドメインの関与

米山弘人, 山本 憲, 藤井重元, 小坂博昭 (香川医大・医・第二生理)

NO合成酵素 (NO Synthase, NOS) は基質L-アルギニンが低濃度のときスーパーオキシド (O_2^-) を産生する。NOと O_2^- は拡散律速に近い速度で反応し、細胞毒性の強いパーオキシナイトライトに変化する。この反応は動脈硬化初期における内皮機能不全、組織の虚血再灌流障害、神経変性の原因として注目されている。全身の神経細胞に存在する神経型NOS (nNOS) の O_2^- 産生部位はフラビンを含むレダクターゼドメインと、ヘムを含むオキシゲナーゼドメインの2説あり、いまだ一致をみていないが、これはNOSの O_2^- 産生とその制御機構という病態生理学的観点から重要な問題である。我々は O_2^- 産生をDMPOを用いたESRスピントラップ法により検討した。フラビンの阻害剤DPI (diphenyliodonium) は20-Mで O_2^- 産生をほぼ完全に抑制した。一方、ヘムの阻害薬であるシアンは高濃度域で O_2^- 産生を阻害した ($\text{IC}_{50} = 3.4 \pm 0.6 \text{ mM}$, $n=3$)。そこで、nNOSのヘム結合部位となっているシステイン残基 (Cys415) をアラニンに置換してヘムを欠失させた変異体 (C415A-nNOS) を作製し、その O_2^- 産生能を測定したところ、天然型nNOSの10%以下であった。以上の結果からnNOSの O_2^- 産生部位がオキシゲナーゼドメインであることを初めて解明した。

7. キンドリングにおける神経系細胞の変性と再生

板野俊文¹, 中川利孝¹, 梅岡秀一¹, 宮本 修¹, 住谷和則², 根木哲朗², 村上哲英³ (¹香川医科大学・生物学, ²基礎スポーツ医学, ³倉敷芸術科学大学・生理学)

キンドリングはヒト側頭葉てんかんのモデルと知られているが、神経細胞の形態変化とけいれん発作の伸展の関連は不明である。我々はキンドリングのけいれん準備性獲得中に脳の各部でアポトーシスがおこること (Epilepsy Res. 42, 97-103, 2000)、神経幹細胞のマーカータンパクであるネスチンの発現を報告した (Epilepsy Res. 43, 249-253, 2001)。今回は電子顕微鏡を用いてさらに詳細な形態学的な検討を行ったので報告する。

キンドリングモデルはラット扁桃核に慢性電極を挿入し、一日2回双極性矩形波で閾値下の刺激を行い、ラシーンの分類によるステージの進行を得る。それぞれのステージでの免疫組織科学的検討を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて行った。ネスチンのモノクローナル抗体 (RAT-401) は

アイオワ大学 DSHB より購入した。

けいれんのステージがあがるにつれ、刺激側の梨状葉で、ついで両側の梨状葉でネスチンが発現する。その発現細胞はアストログリア、神経細胞と血管内皮細胞である。また染色されない細胞でも神経細胞死と関連すると報告されているミトコンドリアの変化も観察された。これらはステージが進行するにつれて顕著となった。

以上よりけいれん準備性獲得の段階で神経系の変性と再生が同時におこり、新しいシナプス結合や可塑性のおこることがてんかん原性の獲得と関連すると考えられる。

8. 牛副腎髄質クロマフィン細胞のCa²⁺動態に及ぼす変動磁界の影響

池原敏孝¹、村戸良平²、朴基豪²、芳地一³、山口久雄¹、細川敬子¹、木内陽介²、吉崎和男¹、宮本博司⁴ (¹徳島大・医・第一生理、²工・電気電子、³医学部附属病院・薬剤、⁴徳島文理大・家政・生活環境情報)

最大磁束密度が1.5T、3秒間隔の間欠的強磁界を発生させ、これを牛副腎髄質クロマフィン細胞に曝露させた。2時間の細胞への磁界曝露はCa²⁺除去液中、ブラディキニン(BK)により誘導される細胞内Ca²⁺の一過性の増加を強く抑制した。そこで、BK添加による細胞内イノシトール3リン酸(IP₃)量の変化を測定したところ、急激な増加が見られたが、磁界曝露による抑制作用は見られなかった。次に細胞膜の透過性を増大させ、細胞内にIP₃を導入させると、細胞内Ca²⁺濃度は著しく増加したが、磁界曝露はこの増加を有意に阻害した。しかし、タブシガルギン存在下、細胞膜を介するCa²⁺フラックスは磁界による影響を受けなかった。また、30分間の磁界曝露によるBK誘導性細胞内Ca²⁺増加の阻害は1時間細胞を磁界外に置くことにより対照群のレベルに回復した。以上の結果より、変動磁界は細胞膜の電気的性質に影響を及ぼし、この影響が細胞内小胞体あるいは小胞体膜に影響を及ぼすのではないかと考えられる。

9. 培養骨芽細胞の分化誘導に及ぼすELF変動磁界の影響

中野芳子¹、細川敬子²、山口久雄²、池原敏孝²、北村光夫²、木内陽介¹、吉崎和男²、宮本博司³ (¹徳島大・工・電気電子、²医・第一生理、³徳島文理大・家政)

ELF (extremely low frequency) 変動磁界が培養骨芽細胞(MC3T3-E1)の分化誘導に及ぼす影響について考察した。ヘルムホルツ型対極式コイルで60Hz、最大磁束密度3mTの正弦波交流磁界を発生させた。培養面での誘導電流密度は平均10mA/m²であった。増殖期と分化期にあ

る骨芽細胞を上記磁界に24時間曝磁すると、細胞質と膜成分のPKC活性はいずれも抑制傾向を示した。特に、増殖期の細胞質での活性は有意に抑制された。これまで曝磁によってMC3T3-E1細胞の分化が誘導されることを報告しているが、曝磁によるPKC活性の抑制が、分化誘導に影響するという可能性が考えられるので、骨芽細胞の分化を誘導する薬剤T3を投与して、分化誘導に及ぼす薬剤効果と曝磁効果を比較した。T3と曝磁によっていずれも、細胞内蛋白質含量は抑制された。また分化の指標であるアルカリホスファターゼ(ALP)活性はT3と曝磁によっていずれも上昇し、T3と曝磁を同時に作用させると、相加的に促進した。一方、PKC活性は曝磁によって有意に抑制されたが、T3投与では影響がみられなかった。以上のように、ELF磁界とT3の分化誘導機構への作用に差異が認められた。これらの結果から、ELF磁界は骨芽細胞の増殖期の細胞情報伝達機構に作用して分化期に誘導するという可能性が示唆された。

10. イヌの胃前庭部伸展による、長経路および短経路反射を介する膵外分泌とインスリン分泌

古川直裕、畑野瑞恵、中村恵美 (川崎医大・生理)

[目的] 長経路および短経路の胃-膵外分泌促進反射を誘発する胃前庭部の伸展刺激により、実際に膵臓支配の神経活動が増加するかどうか、また同時にインスリン分泌も増加するかどうかを検討した。[実験方法] 導入麻酔後除脳した雑種成犬を用い、ガラミン投与、人工呼吸下の実験した。胃前庭部に隔壁付バルンを挿入し、胃前庭部の伸展と胃前庭部内圧の測定に用いた。実験は2群に分けて行い、一群では、膵臓内を走行する神経枝の遠心性活動を双極白金電極で導出した。他方の群では、両側内臓神経を切断し、主膵管からの膵外分泌量と、5~10分毎の血清インスリン濃度を測定した。[結果] 膵臓内を走行する神経枝は両側頸部迷走神経と内臓神経の刺激に応答し、胃前庭部の伸展で活動が著明に増加した。この増加反応は迷走神経、内臓神経切断後もほとんど残存し、短経路の反射性増加が強いことを示唆した。一方他群の内臓神経切断動物において、胃前庭部の伸展刺激は膵外分泌の増加とともに血清インスリン濃度の上昇も誘発した。迷走神経切断後もインスリン分泌の増加反応にはほとんど変化が見られず、膵外分泌促進反応も減弱はしたが、かなり残存した。[考察] これらの結果は、短経路の胃-膵外分泌促進反射の重要性を示唆するとともに、glucoseの摂取を直接には意味しない、消化管の運動自身によってもインスリン分泌が調節されていることを示している。

11. 筋ジストロフィーは筋成長障害：成長関連肥満と男女差

戸塚 武, 渡辺貴美 (愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・生理学部)

ジストロフィン離れが進み, 筋ジストロフィー (MD) 研究は再び深刻な混乱状態に陥ってしまった。これは, 通説が間違っているためであろう。我々は, MDモデル動物のdyマウスの初期病態は, 筋変性 (通説) ではなく筋成長障害で, 筋病変と症状の悪化に骨の伸長成長が関係しているだろう (筋-骨不均衡説) と提唱してきた。

さて, MDは男性に好発する。これは, MDの中で最も頻度の高いDuchenne型MDがX染色体性劣性遺伝するためとされるが, 我々は, 成長特性の男女差による可能性を想定し, 健常男女の成長 (資料: 厚生省国民栄養調査と文部省学校保健統計調査) を分析し, いくつかの男女差を観た: 女子の特徴として, 身長を体重の立方根で割った値が11歳過ぎから急速に減少し, 15歳頃以降は6歳頃の低い値で落ち着くこと, 身長と体重の個人差の山が女子では10歳頃で一致したのに, 男子では身長の変化が大きく遅れることなどが分かった。今回, 男子に特徴的に観られる相対身長成長の小休止期 (8~11歳頃) にほぼ一致して, 肥満傾向が男子に好発することが分かった。二つの現象に因果関係があり (骨成長が, 筋成長を促進する一方, 反作用的に抑制される?), この時期に関わる筋成長障害がDMDの成因ではないだろうか。

12. 幼若ラットのにおいの学習における嗅球内mGluR2アゴニスト注入の効果

奥谷文乃^{1,2}, 梶 秀人^{1,2} (1高知医科大学・第一生理学教室, 2CREST)

生後11日目の幼若ラットににおいと電撃の対提示トレーニングを施すと, 翌12日目のテストではにおいに対する嫌悪反応を示す。このにおいの学習が成立するメカニズムとして, 体性感覚刺激による遠心性ノルアドレナリン線維の活性化による, 嗅球僧帽細胞の脱抑制が考えられている。一方, 免疫組織化学およびin situ hybridization法により, 嗅球の外叢状層と顆粒細胞層にはmGluR2が多く発現していることが証明されている。また顆粒細胞のmGluR2を刺激するとGABA放出が抑制されることが示唆されている。今回われわれはトレーニング前日に冷却麻酔下で嗅球に埋設したカニューレから, mGluR2のアゴニストであるDOG-IVをトレーニング中に注入し, においの学習への効果を観察した。するとにおいと電撃の対提示によるにおいの嫌悪学習は全く阻害されなかった。さらににおいの単独暴露トレーニングでもラットはにおいに対する

嫌悪反応を示すようになった。これらの結果より, 樹状突起間シナプスにおいて顆粒細胞のmGluR2を介する僧帽細胞へのGABA放出抑制が, 僧帽細胞の脱抑制をひき起こし, これによりにおいの学習が成立したと推測された。

13. 副嗅球におけるシナプス長期増強

黄 光哲¹, 梶 秀人^{1,2} (1CREST, 2高知医科大学・第一生理学教室)

フェロモン記憶の座は副嗅球であることはすでに行動薬理的及び形態学的に同定されたが, 副嗅球におけるシナプス可塑性について電気生理学的な証拠はまだ得られてない。本研究では, 副嗅球スライスを用いて, 副嗅球の重要なシグナル伝達回路である相反性シナプスの興奮性シナプス伝達について解析を行った。外側嗅索を電気刺激し, 僧帽細胞樹状突起から顆粒細胞樹状突起への興奮性シナプス後電位fEPSPを外叢状層で記録した。non-NMDA受容体アンタゴニストCNQXはfEPSPを遮断したが, NMDA受容体アンタゴニストAP5はfEPSPにほとんど影響がなく, 僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達のほとんどはnon-NMDA受容体によって担われているものと思われる。この興奮性シナプス伝達の長期増強 (LTP) は, 外側嗅索の短期間高頻度刺激 (100Hz, 100発, 3分間隔4回) ではLTPが誘導されず, 比較的低い頻度での長時間刺激 (10Hz, 20発, 3分間隔20回) により誘導された。この結果はフェロモンの記憶の形成に比較的長時間 (5~6時間) が必要であることと一致する。LTPの誘導はAP5により遮断され, このLTPがNMDA受容体依存性であることが明らかとなった。また, フェロモン記憶に不可欠なノルアドレナリンは α 受容体を介してLTPの発現に促進的に作用していることも判明した。

14. におい学習におけるCaMキナーゼIIとMAPキナーゼ阻害剤投与の影響

張 敬姫^{1,2}, 奥谷文乃^{1,2}, 梶 秀人^{1,2} (1高知医科大学・第一生理学教室, 2CREST)

長期学習成立に必須である新規遺伝子発現に, 転写調節因子CREBのリン酸化が幼若ラットのにおい嫌悪学習にも必要であることを報告した。しかしにおい嫌悪学習におけるCREBのリン酸化のメカニズムについてはまだ不明である。そこで幼若ラットのにおい嫌悪学習における細胞内機構を解析する目的で, 生後10日目 (PND10) に冷却麻酔下にて, フレンジ付テフロンチューブに接着させた薬物注入用ステンレスチューブを頭蓋骨上に留置した。翌日 (PND11) ラットの嗅球内にmitogen-activated protein (MAP) キナーゼ阻害剤であるPD098059とCaMキナー

ゼIIの阻害薬であるKN-62をそれぞれ嗅球内に注入しながら、においと電撃の対提示トレーニングを行ない、1時間後に嗅球を摘出し、抗P-CREB抗体と抗CREB抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った。また一方では、同じ方法でトレーニング翌日に、においの嫌悪学習成立の有無を行動学的に解析した。その結果CREBの発現には差がなかったがリン酸化CREBの発現がコントロール（100% DMSOの嗅球内注入）より減少した。またにおいの嫌悪学習もMAPキナーゼとCaMキナーゼII阻害剤によって阻害された。以上の結果からMAPキナーゼとCaMキナーゼIIがCREBのリン酸化を起こし、幼若ラットのにおい学習の成立に関与することが示唆された。

15. Overexpression of cyclin D1 and CDK4 in laryngeal squamous cell carcinoma and its prognostic significance

Youyi Dong, Li Sui, Yasuo Watanabe, Katsuyoshi Sugimoto, Masaaki Tokuda (1st Dept of Physiol, Kagawa Medical University, Kagawa)

Cyclin D1 and its catalytic partner CDK4 are known to play important roles in the G1/S checkpoint of the cell cycle. We immunohistochemically investigated the expression of cyclin D1, CDK4, and PCNA in 102 patients with laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC). The results show that cyclin D1 overexpression was observed in 59 cases (57.8%) of LSCC, and was significantly correlated with tumor site, tumor size, lymph node metastasis, and advanced stage. CDK4 overexpression was observed in 48 cases (47.1%), and was significantly correlated with tumor size and advanced stage. The Kaplan-Meier analysis showed that cyclin D1 overexpression was significantly associated with disease-free and overall survival, and CDK4 overexpression with overall survival. These findings indicated that cyclin D1 and CDK4 overexpression may play a pivotal role for the biological characteristic of LSCC and may provide the strongest prognostic implication.

16. Inversed Expression of Jab1 and p27kip1 in Epithelial Ovarian Tumors

Li Sui, Youyi Dong, Yasuo Watanabe, Katsuyoshi Sugimoto and Masaaki Tokuda (1st Dept of Physiol, Kagawa Medical University, Kagawa)

Jab1 (Jun activation domain-binding protein 1) has been described as a coactivator of AP1 transcription factor, and

is a subunit of a large protein complex (called the COP9 signalosome). Recent study found that Jab1 protein can cause breakdown of p27kip1 protein in mammalian cells. In order to investigate whether Jab1 expression is correlated with p27kip1 protein levels as well as its clinical relevance, we evaluated the expression of Jab1 in 80 cases of epithelial ovarian tumors. Jab1 overexpression was detected in 68.1% (32/47) of malignant tumors, and 33.3% (11/33) of benign tumors. The positive ratio of Jab1 was increased from benign to malignant ovarian tumors ($p = 0.002$). A negative correlation between Jab1 and p27kip1 expression was found in both benign and malignant ovarian tumors. Kaplan-Meier survival analysis showed that Jab1 overexpression was significantly associated with poor prognosis of patients. Jab1 expression is inversely correlated with p27kip1 expression levels, and Jab1 as a negative regulator of p27kip1 might be associated with the progression and prognosis of epithelial ovarian tumors.

17. 血管のCa²⁺非依存性収縮におけるRhoA-Rho-kinase情報伝達系の役割

関口壽恵, 黒川 徹, 最上紀美子, 水上洋一, 青木浩樹*, 小林 誠 (山口大・医・器官制御医科学講座・分子細胞生理学・旧第一生理, *分子脈管病態学講座)

高血圧や血管攣縮などの血管異常収縮の病態として血管のCa²⁺非依存性収縮が注目されている。その情報伝達分子として、低分子量G蛋白RhoAとその標的分子のRho-kinase (ROK) が同定されている。今回、我々は、血管のCa²⁺非依存性収縮におけるRhoA-ROK情報伝達系の役割を定量的に検討するために、 β -エスシン処理によってウシ中大脳動脈中膜条片のスキンド（細胞膜に小孔を開けた）標本作製し、RhoA, ROKをそれぞれ特異的に阻害するボツリヌス菌C3酵素およびROKのdominant negative体を細胞内へ投与し、Ca²⁺非依存性収縮に対する抑制効果を検討した。トロンボキサン受容体刺激（U46619 + GTP）およびG蛋白活性化（GTP γ S）によるカルシウム非依存性収縮に対して、ボツリヌス菌C3酵素は、それぞれ約70%、約40%の抑制効果を示したのに対し、ROKのdominant negative体は、それぞれ約25%、約15%の抑制効果を示した。以上の結果より、脳血管のCa²⁺非依存性収縮のメカニズムとしてRhoA-ROK情報伝達系のみならず、その他の細胞内情報伝達系の重要性も示唆された。

18. レーザーピンセットを用いた刺激負荷に対する培養血管内皮細胞のカルシウム応答解析

片岡則之^{1,3}, 橋本 謙^{2,3}, 立花博之¹, 小笠原康夫¹, 辻岡克彦², 梶谷文彦^{1,3} (¹川崎医科大学・医用工学, ²川崎医科大学・生理学, ³岡山大学・医歯学総合研究科・システム・循環生理学)

血管内皮細胞は血流によるずり応力や血管壁の伸展などのメカニカルストレスに反応して形態や機能を変化させることが知られているが, いかにしてメカニカルストレスを感知してこれらの反応を起こすか, といったメカニズムは明らかとなっていない. 本研究では, 内皮細胞の力学刺激の感知機構を検討するため, 非接触で微小な物体を捕捉可能なレーザーマニピュレーションシステムを用いて, 培養血管内皮細胞に刺激負荷を行い, 細胞内カルシウムイオン濃度の反応を調べた. 実験にはウシ大動脈由来内皮細胞を用いた. 出力2.5W, 波長1064nmのレーザー光源 (YAGレーザー) から発したレーザーを細胞核近傍に照射し, レーザーの集光位置の移動を行った. その結果, レーザー照射時には細胞内カルシウムイオンの濃度上昇は起こらなかったが, 集光位置の移動を行うと細胞内カルシウムイオン濃度上昇が観察され, さらに周辺の細胞へのカルシウムイオンの伝搬も見られた. この結果は, 細胞核などの細胞内小器官を捕捉, 移動させることによって生じた細胞内の微小なひずみに内皮細胞が応答してカルシウムイオン濃度の上昇が起こったものと考えられる. 血管内皮細胞が血流や血管壁の伸展といったメカニカルストレスに反応する際, 細胞に生じる微小なひずみ, あるいは細胞内に生じる応力変化がメカニカルストレスの感知に大きく関与しているものと推測される.

19. 低温保存心の移植時の力学的・エネルギー学的検討

大島 祐, 荒木淳一, 清水壽一郎, 入部玄太郎, 今岡丈士, 藤中和三, 清岡崇彦, 土井ゆみ子, 梶谷文彦 (岡山大学大学院・医歯学総合研究科・システム循環生理学)

移植直後のドナー心のメカノエナジェティクスを明らかにし, 異なる心筋保護液の心筋保護効果を生理学的に検討した. イヌ交叉灌流摘出心臓標本を作成し, 正常心群 (N群; n = 9) は虚血なしとした. University of Wisconsin Solution液 (UW液) による保存心群 (U群; n = 7), Celsior液による保存心群 (C群; n = 7) では各々の保護液で心停止し, 4℃で4時間保存した後血液再灌流した. 各群において再灌流1時間後 (正常心群においては交叉灌流確立1時間後) に E_{max} , V & O_2 -PVA 関係を解析し, その後 Ca^{2+} の冠注により収縮性を増大させ E_{max} の酸素コス

トを求めた. 再灌流後の E_{max} はN群, C群に比しU群で有意に低下していた. PVAの酸素コストは各群に有意差はなかった. E_{max} の酸素コストはU群, C群ともN群より有意に増大していた. UW液による保存心では収縮性の低下に比し心筋酸素消費量が相対的に多く, スタン心と同様のエネルギー学的特徴を示していた. Celsior液による保存心では E_{max} の酸素コストは増大していたが収縮性は高く保持され, その優れた心筋保護効果が示唆された.

20. 実験的局所脳虚血モデルでの, エネルギー・蛋白代謝障害の経時的变化

秦 龍二, 小西吉裕, 田中潤也 (愛媛大学・医学部・第一生理)

局所脳虚血・再灌流時にはエネルギー・蛋白代謝障害が経時的に変化していくのは良く知られた事実ではあるが, その詳細に関しては未だ明らかではない. 今回我々は脳組織ATPと脳組織蛋白合成能 (CPS) を測定し, 中大脳動脈永久閉塞時と1時間虚血再灌流時における両者の経時変化を検討した. 対象としてC57black/6マウスを用いた. 永久閉塞群として, 閉塞後1, 3, 6, 24, 72時間後 (各群 n = 5) に脳を摘出した. また再灌流群としては1時間の虚血負荷後血流再開し, 1, 3, 6, 24, 72時間後 (各群 n = 4~5) に脳を摘出し, ATPとCPSを測定した. その結果, 永久閉塞群ではATP障害領域は時間と共に増大し, 1日目にはCPS障害領域とはほぼ一致した. 再灌流群では, 再灌流1時間目にてATP障害領域は一時的に消失した. その後再出現し, 3日目にはCPS障害領域と一致した. これらの所見は虚血性脳血管障害の病態生理機構を考えるうえで, 有用な基礎データと考えられた.

21. 内耳血管条の微小循環システムにおける虚血の影響

安藤元紀, 佐藤隆幸 (高知医科大学・第二生理学)

[目的] 内耳血管条辺縁細胞は, 電子顕微鏡的観察よりその細胞質の電子密度の高さから '暗細胞' とよばれている. これまで正常像とされていたこの特徴が, 組織固定操作に伴う循環不全に起因する細胞障害を反映している可能性を調べるため, 新たな固定手技を開発し検討した.

[方法] スナネズミを麻酔・人工呼吸管理下に蝸牛を露出・血流を保持し, 固定液を外リンパ灌流したものをA群 (新法), 断頭3分後に固定液を外リンパ灌流したものをB群 (虚血群, 従来法) とし, 電子顕微鏡観察を行った.

[結果] A群では従来の報告と異なり, 辺縁細胞の細胞質の電子密度の上昇はなく, 他の血管条構成細胞のひとつの中間細胞のそれと有意な差は認められなかった. B群で

は辺縁細胞の暗細胞化（中間細胞の電子密度に比して1.7倍）と同時にミトコンドリアの膨化（A群辺縁細胞におけるミトコンドリアの体積分率に比して1.3倍）を認めた。

〔考察〕内耳血管条はその上皮細胞である辺縁細胞が基底膜を伴わずに毛細血管網とじかに接するという特異な微小循環システムを有し、この構造が辺縁細胞の活発なイオン輸送を維持するために必要であると考えられている。今回得られた結果は、同様に高い代謝活性を示す脳や心臓での虚血により誘導される細胞傷害（ネクローシス・アポトーシス）と類似する現象と推測される。今後、辺縁細胞において軽度の虚血で細胞障害が誘起される意義、微小循環不全と聴覚機能障害の関連について調べていきたい。

22. 高血圧症、高脂血症ラットモデルにおける血管内皮細胞機能の変化

麻原仁子, 樋口洋造, 川田和幸, 辻岡克彦 (川崎医科大学・生理学)

粥状動脈硬化病変は動脈の湾曲部, 分岐部に局在化して発症することが病理学的研究により明らかにされている。著者らはWKYラットを用いた免疫組織学的手法から, 動脈硬化好発部位である大動脈-腎動脈分岐部頭側でNO産生量, eNOS発現量ともに, 非好発部位である腎動脈末梢部位に比べて有意に減少していることを見つけ, 局所血流の違いがeNOS発現量の差異を介してNO産生量に差を生じ, 動脈硬化の発症・進展が局在化するという機構を示唆した。本研究では, ラットに動脈硬化発症のリスクファクターである高血圧症または高脂血症を起こさせることによる血管内皮細胞機能の変化を調べることを目的とした。Dahl食塩感受性ラット40匹に高血圧食または高脂血症食を与えて, 各々のNO産生量, eNOS発現量を大動脈-腎動脈分岐部の動脈硬化好発部位と非好発部位で比較検討した。血圧, 体重および血清検査も同時に行った。高血圧食群では血圧は0週と比較して2週で平均13.0%, 4週で平均13.8%上昇したが, NO産生量およびeNOS発現量の局所分布に明確な差異を認めなかった。これに対し, 高脂血症群では総コレステロールは2週で平均9.1倍, 4週で平均9.6倍に上昇し, NO産生量およびeNOS発現量は分岐部頭側で低下傾向を認めた。これらのことから動脈硬化発症局在化におけるNO産生量の差異の関与については高血圧と高脂血症では異なる可能性がある。

23. 蛍光マーカーによる脳細動脈・細静脈内血流速の可視化解析

宮坂武寛¹, 柿本亜希¹, 杉本彰子¹, 藤原直子¹, 氷見直之¹, 畑野瑞恵¹, 山根正信², 辻岡克彦¹ (¹川崎医科大学・生理, ²川崎医療短期大学)

従来, 蛍光物質により標識した赤血球や血小板を用いた血流の観察は行われてきたが蛍光強度が微弱なため, 血管壁の相対的に大きな細動脈・細静脈では血流観察は困難であった。このため, 我々はドラッグデリバリーシステムに用いられる高分子ミセルに着目し, 薬物の代わりに蛍光物質を高濃度で包含すれば, 高輝度なマーカーを作製できると考えた。このミセルをマーカーとし, 脳細動脈・細静脈の血流を可視化して蛍光顕微鏡により観察した。実験には雑種成犬を使用し, 全身麻酔・人工呼吸器下で実験した。蛍光ミセルとしてフォトポリマー用感光色素と親疎水ブロック共重合体をジメチルアセトアミドに溶解し, リン酸緩衝液に対して1日透析することにより, 蛍光色素を包含した高分子ミセルを作製した。そのミセルを甲状腺動脈から注入し, 蛍光顕微鏡により脳軟膜血管を観察した。蛍光ミセル像を解析することにより血流速を計測した。蛍光ミセルは直径200 nm程度であるが, 蛍光強度は蛍光標識赤血球のそれに比べて明るく, 蛍光標識赤血球では観察できなかった直径60 μm程度の細動脈・細静脈中のマーカー観察に成功した。蛍光ミセル像の解析により, 脳細動脈・細静脈の血流速を測定した結果, 細動脈では2~8 mm/s, 細静脈では1~3 mm/sであり, 脳の細動脈内血流速は細静脈内血流速より数倍速いことが明らかとなった。また, 細動脈とも血管径が大きいほど血流速は大きかった。

24. SHRの上腸間膜動脈血管抵抗における内因性 vasopressin の役割

梶原賢二¹, 寺西泰弘² (¹広島大学・医学部・第二内科, ²第二生理)

NCRと比べて, SHRの頸動脈, 腎動脈, 上腸間膜動脈, 腹部大動脈末端の血管抵抗は全て上昇している。これらの血管抵抗のうち, 腎動脈, 腹部大動脈末端の血管には交感神経の緊張があり, 特に腹部大動脈末端の血管ではこの緊張が著しい。しかし, SHRの上腸間膜動脈の血管抵抗上昇の原因は不明である。今回の研究で, わずかな脱血と交感神経節遮断ののち, V1 antagonistを投与すると, 血圧と上腸間膜動脈の血管抵抗の著しい下降を観察した。SHRの上腸間膜動脈の血管抵抗上昇には内因性 vasopressin が関与している。