

第53回西日本生理学会

会 期：平成14年10月11日（金）～12日（土）

会 場：鹿児島県市町村自治会館

当番幹事：鹿児島大学

1. CaMKIIの阻害剤は心筋L型Ca²⁺チャネル電流を減少する

Hao Li-Ying, 徐 建軍, 亀山亜砂子, 蓑部悦子, 亀山正樹（鹿児島大学医学部第二生理学講座）

カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII（CaMKII）は様々な生理機能を調節する。最近、CaMKIIがイオンチャネルの機能にも調節していることが報告されている。一方、我々は心筋L型Ca²⁺チャネルのrun-down現象を研究してきて、Ca²⁺チャネルの基本活動が細胞内因子によって維持されるという機構を提唱している。そこで、今回、Ca²⁺チャネルの基本活動がCaMKIIに調節されるか、さらに細胞内因子による調節機構にCaMKIIが関与しているかについてモルモット心室筋細胞でパッチクランプ法を用いて調べた。実験に使った細胞内因子としては牛心臓組織からゲル濾過法により抽出したP分画（分子量25～30万の分画）とH分画（分子量30万より大きい分画）と3mM ATPを用いた。結果：（1）cell-attached patchでCaMKIIのinhibitor（KN-93 1 μM, 10 μM；KN-62 2 μM, 20 μM）の効果を観察した。Ca²⁺チャネルの活性はそれぞれコントロールの69.5 ± 9.9%, 26.2 ± 3.8%, 55.0 ± 15.2%, 32.0 ± 10.5%までに抑えられた。KN-92（KN-93のinactive analogue）は抑える効果が見られなかった。（2）inside-out patchによって消失したCa²⁺チャネルの活性は細胞内因子の投与により回復したが、この回復はCaMKIIのinhibitor（KN-62）によって濃度依存的に抑えられた。これらの結果から、Ca²⁺チャネルの基本活動がCaMKIIに調節されると考えられ、さらに細胞内因子の調節機構がCaMKIIを介したものである可能性があると考えられた。

2. 心血管系変動に関連したラット島皮質後方部ニューロン活動

花森隆充（宮崎医大第一生理）

ラット島皮質後方部ニューロンは味覚、内臓感覚及び痛覚などの様々な感覚刺激に応答する（Hanamori et al, 1998）。島皮質後方部ニューロンからガラス微小電極で細胞外記録中に血圧（BP）及び心拍数（HR）に関連して変動する3個のニューロンが得られた。これらのニューロン

について解析を行った。実験にはSDラットを用い、ウレタンとαクロラロースの混液による麻酔下で手術及び記録を行った。unit-c0408002. ニューロンが約10分間自発放電の周期的変動を示した時に、ニューロン活動（INS, spikes/s）、BPとHR間の相関を調べた。HRが400（bpm）より低い場合はINSとBP（あるいはHR）の相関は低かったが（INS-BP, $r = -0.20$ ；INS-HR, $r = 0.14$ ；BP-HR, $r = -0.65$ ）、400以上になると高い相関が見られた（INS-BP, $r = 0.51$ ；INS-HR, $r = 0.55$ ；BP-HR, $r = 0.76$ ）。このニューロンはHRが400以上の上昇に、又そのレベルではBPは最小値を示していたが、そこからのBPの上昇に対応して自発放電が増加することを示す。unit-c0614002. このニューロンの自発放電はBPの低下に対応して増加した（INS-BP, $r = -0.41$ ；INS-HR, $r = 0.03$ ；BP-HR, $r = -0.01$ ）。unit-c0621002. このニューロンはBPとHRの上昇に対応して自発放電が増加した（INS-BP, $r = 0.37$ ；INS-HR, $r = 0.4$ ；BP-HR, $r = 0.74$ ）。以上の結果から島皮質後方部に血圧や心拍数の自発的な変動に関連して自発放電が変化するニューロンの存在が示された。

3. 無麻酔ラットにおける高二酸化炭素の循環動態への影響と末梢化学受容器の関与

及川 秀¹, 平川晴久², 林田嘉朗²（産業医科大学¹第2内科, ²応用生理学）

【目的】正常酸素分圧下における高二酸化炭素の自律神経及び心血管系に対する影響とそのメカニズムを調べることを目的とした。

【方法】腎交感神経活動（RSNA）記録用電極と血圧（BP）測定用カテーテルを植え込んだ意識下のラットを用い、CO₂：6%の暴露を20分間行った。O₂濃度は、過呼吸による高酸素血症を避けるために16%とした。実験は、末梢の化学受容器の役割を調べるために正常（intact）ラット, aortic nerveを切除した（AN）ラット, carotid bodyを除去しaortic nerveを切除した（CBAN）ラットの3群について行った。血圧を変化させた時のRSNAおよび心拍数（HR）の変化より、各々曲線を求め、圧受容器反射による循環調節の検討も行った。

【結果】高二酸化炭素暴露により, intact では, BP, RSNA, 呼吸数は増加し, 心拍数 (HR) は低下した。末梢の化学受容器を除去した AN および CBAN では, BP, RSNA, 呼吸数は増加したが, HR は変化しなかった。BP と RSNA, BP と HR いづれの関係においても, 曲線の最大反応域, 傾きは増加し, 右方にシフトした。

【考察】高二酸化炭素暴露による BP 及び RSNA の変化は, 中枢の化学感受領域を介し, HR の変化は, 末梢の化学受容器を介する作用と考えられた。高二酸化炭素暴露により圧受容器反射感度は増加した。

4. 筋細胞の Force-velocity relationship 負荷に耐えながら頑張る分子群

緒方道彦 (九州大学健康科学センター)

筋収縮の基本単位はアクチンとミオシンの化学反応である。この分子レベルの現象が試験管内の溶液の動態で説明されている。液中の分子数は膨大であるにも拘らず個々の独立な分子の様子が理解可能な根拠は分子反応の独立性と加成性にある。

筋細胞レベルの収縮現象に関わる分子数もまた膨大であるが, 総体としては極めて整然とした生理機能を発揮している。

骨格筋は膨大な分子群が一次元の変位と応力形成をするように進化しているシステムであり, 数理解析の対象として好都合である。そこでカエル筋標本を用い, 階段状に伸展し静止的張力と, その負荷時の単収縮曲線を記録した。

結果を数理解析することにより, ミオシンを一端固定のバネ振動子とみなすと, Ca 濃度が低い (静止筋) とときは, ミオシンは一次元単純酔歩過程でアクチンとランダムな結合を繰り返し, 筋細胞のゴム状弾性を保っており, 筋小胞体からの Ca 放出が全域的に起る (興奮時) と, 個々の独立な分子反応の時間経過が揃い易くなるため, 確率的にはポアソン過程で近似し解析が出来ることが解かった。

5. 心筋 Gap junction Connexin 43 のリン酸化に対する cGMP の影響

海 琳, 今永一成 (福岡大学医学部生理学)

【目的】心筋において, Gap junction (GJ) は細胞間電気的結合の場として重要な役割を果たしており, この機能は GJ channel 構成蛋白 connexin (Cx) のリン酸化によって制御される。私たちはこれまで, 心室筋に優位に発現する Cx43 の PKA 依存性リン酸化, PKC 依存性リン酸化について報告してきた。今回は PKG の活性化が Cx43 のリン酸化に対する効果を検討した。

【方法】モルモット心臓において, 8-bromo cyclic GMP

を Langendorff 法でかん流し, その標本について, 細胞間電気的結合, Cx43 のリン酸化, 発現をそれぞれ細胞群の内部抵抗 (ri), Cx43-monoclonal antibody を用いて Western Blot, Immunohistochemistry で評価した。

【結果】cGMP は ri を上昇させ, PKA 依存性リン酸化を抑制した。また, cGMP は Cx43 をリン酸化させるものの, 発現, タンパク量を抑制した。また, 細胞接合部における Cx43 の免疫反応部面積を減少させた。

【総括】心筋において, PKA 活性化は Cx43 を up-regulation させるが, PKG 活性化はこれに抑制的に働く。また, Cx43 は PKG 依存性リン酸化により Proteolysis を受け易くなり, 結果的に Gap junction communication 機能障害をもたらす可能性が示唆された。

6. 細胞外 Ca^{2+} レベルの低下によって活性化されるマウス心室筋細胞の非選択性陽イオン電流

塩谷孝夫 (佐賀医科大学学生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

マウス心室筋細胞から膜電位を記録し, 無 Ca^{2+} タイロード液で灌流すると, 静止膜電位が脱分極する現象が観察される。この原因を, 細胞をホールセルクランプ法により膜電位固定して調べた。細胞は, 成体マウスの心臓をコラゲナーゼ処理することで単離し, 37°C の DMEM 培養液中に保存した。外液からの Ca^{2+} 除去は, 細胞に膜電流を誘発して, 膜コンダクタンスを上昇させた。この膜電流は, コンダクタンス $54.7 \pm 31.6 \text{ S/F}$, 逆転電位は $-2.2 \pm 4.6 \text{ mV}$ ($n=7$) であった。この電流は, Ca^{2+} 再投与により可逆的に非活性化され, その時間経過は活性化のそれより著しく早かった。この電流は, 一価陽イオンに対して選択的透過性を持ち, その逆転電位は外液の一価陽イオン (Cs) 濃度に強く依存した。また, Na^{+} , Cs^{+} , K^{+} が電流のキャリアになった。しかし, NMG^{+} では電流を記録できなかった。この電流は, $+40 \text{ mV}$ 以下ではほとんど時間依存性がなかったが, それよりも脱分極側では, ゆっくりとした時間依存性の活性化が認められた。

7. 高齢者の寒冷曝露に対する体温調節反応

佐川寿栄子, 筒井由香, 遠藤 豊, 白木啓三 (産業医科大学第二生理学)

加齢に伴う自律機能の低下は, 高齢者の体温調節機能に影響を及ぼす可能性がある。寒冷曝露時の自律神経を介した末梢血管応答は熱放散量を変化させ, 体温の維持に重要な役割を果たしている。本研究は高齢者の寒冷曝露時の体温調節機能を明らかにする目的で 9 名の健康な高齢男子 (66.3 ± 1.2 歳) に 15°C , 90 分間の寒冷ストレスを与えた

時の深部体温の変化、前腕血流量、皮膚熱放散量及び代謝性熱産生量を測定し、10名の若年男子 (22.1 ± 1.2 歳) のそれと比較検討した。その結果、高齢者では寒冷曝露時の食道温の低下が若年者に比べて大であった (0.6 ± 0.2 °C vs. 0.1 ± 0.1 °C, $P < 0.05$)。高齢者の前腕血流量及び皮膚熱コンダクタンスは寒冷曝露により低下したが、低下の大きさは若年者に比べて小さく ($P < 0.05$)、高齢者で末梢血管収縮反応の抑制が示唆された。これは皮膚からの熱放散量が若年者より高値 ($P < 0.05$) であったことと合致した。一方、震えによる代謝性熱産生量の増加は高齢者で抑制されず、主観的温度感覚は高齢者でより寒く感じた。以上の結果から、高齢者は寒冷曝露に対する末梢血管収縮反応が減弱する結果、皮膚からの熱放散量が抑制されず、体温の維持が若年者に比べて困難であると結論した。

8. 高齢者の頸動脈壁の伸展性と圧反射機能

筒井由香, 山内克哉, 遠藤 豊, 佐川寿栄子, 白木啓三 (産業医科大学第二生理学)

頸動脈壁の伸展性と心拍の圧反射機能との関連を調べるために、高齢男子 (69 ± 1 歳) と若年男子 (22 ± 1 歳) を対象に、非侵襲的に頸動脈圧を測定 (トノメトリー法) して脈圧と頸動脈壁の心周期に伴う径の変化 (超音波診断装置) から、頸動脈壁のコンプライアンスを推定した。さらに頸動脈圧を用いて血管作動薬 (フェニレフリンもしくはニトロプルシド) の静脈内投与による昇圧時と降圧時の心拍の動脈圧反射機能を評価した。高齢者では若年者に比べ、頸動脈壁のコンプライアンスが低下し (0.06 ± 0.01 vs. 0.14 ± 0.01 mm³/mmHg, $p < 0.05$)、昇圧時、降圧時ともに収縮期血圧の変化に対する心拍の応答も有意に低下していた (昇圧時 15.0 ± 2.3 vs. 3.7 ± 0.4 ms/mmHg, $p < 0.05$, 降圧時 7.2 ± 0.8 vs. 3.2 ± 0.4 s/mmHg, $p < 0.05$)。頸動脈壁のコンプライアンスと心拍の動脈圧反射機能との間には正の相関関係が認められた ($p < 0.05$)。高齢者では頸動脈壁の伸展性が低下しているために、頸動脈収縮期血圧の変化に対する心拍の圧反射機能が減弱している可能性が示唆された。

9. クロット形成後トロンビンは家兎培養血管平滑筋細胞の形質変換を惹起する

島田誠二, 砂川昌範, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部生理学第一講座)

クロット形成後トロンビン (B-thr) が家兎培養血管平滑筋細胞 (VSM) の形質変換を惹起するかを、ミオシン重鎖 (MHC) アイソフォーム (SM1, SM2 及び SMemb) mRNA の発現局在及び発現量を *in situ* hybridization

(ISH) 法と RT-PCR 法で測定した。合成トロンビン特異的阻害剤アルガトロパンの存在または非存在下で、VSM を B-thr (10 unit/ml) 添加 10% FBS-DMEM 培地で 48 時間培養を行った。RT-PCR 法の結果では、B-thr は SMemb mRNA 発現量のみが増加した。この発現量増加はアルガトロパンにより抑制されなかった。また、アルガトロパンは SM2 mRNA 発現量を有意に減少した。ISH ではアルガトロパンと B-thr 間に MHC mRNA 発現局在に差はみられなかった。無血清培地下で、血小板由来成長因子 (PDGF)-BB の刺激により、SMemb mRNA 発現量の変化はみられなかったが、アルガトロパンまたは抗 PDGF-BB 抗体存在下で、PDGF-BB は SMemb mRNA 発現量を増加した。従って、1) B-thr はそのトロンビン活性非依存性に VSM の形質変換を合成型へと誘導する。2) アルガトロパンの形質変換作用には、PDGF-BB との関連が示唆された。

10. ラット大動脈由来内皮細胞は、クロット形成後トロンビン刺激により t-PA を放出する

瀧澤 初, 中村真理子, 仲宗根敏幸, 小杉忠誠 (琉球大学医学部生理学第一講座)

PTCA, PTCR 後の凝固亢進、血管再狭窄の発症機序にクロット形成後トロンビン (B-thr) の関与が注目されている。我々は、これまでに B-thr の物理化学的性質を検討してきた。しかしながら、B-thr の内皮細胞への作用は未だ明らかにされていない。本研究では、B-thr がラット大動脈由来内皮細胞 (RAECs) から plasminogen activator (PA), plasminogen activator inhibitor (PAI) を放出させるか、否かを知るために Fibrin autography 法, Western blotting 法を用いて実験を行った。Dual chamber に培養した RAECs は、95~100 IU/ml の活性を有するトロンビン (N-thr), B-thr で、24 時間刺激した後、その上清を回収した。その培養上清から euglobulin を作製し、Fibrin plate にて PA 活性を測定した。さらに、PA の同定を行うために各種 PA 抗体を含む Fibrin autography 法を行った。また、回収した培養上清を濃縮し、PAI-1 抗体を用いた Western blotting 法にて、培養上清中の PAI の有無を検討した。その結果、B-thr は N-thr と同様に RAECs から PA を放出した。その PA 活性は N-thr 刺激のほうが B-thr 刺激に比べて高い値を示した。一方、Fibrin autography 法の Lytic zones は 67 KDa, 116 KDa にみられ、これらの Lytic zones は t-PA 抗体で抑制された。さらに、PAI-1 抗体を用いた Western blotting 法では、50 KDa の band が N-thr, B-thr 刺激後培養上清中にみられた。本実験にて B-thr はラット大動脈由来内皮細胞 (RAECs) から、t-PA, PAI-1 を放出させた。

11. 膝関節滑膜細胞におけるゼラチナーゼの発現調節—ヘモグロビンの影響—

田島卓也, 吉田悦男, 大村さゆり, 杉木雅彦, 丸山真杉 (宮崎医科大学生理学第二講座)

リウマチや血友病などでは反復する関節内出血の結果, 関節構成成分の炎症および破壊が進行し関節の変形, 荒廃へと至る. 一方, 種々の関節炎において関節液中の Matrix metalloproteinases (以下 MMP) の活性亢進が認められている. また, われわれの教室では創傷治癒の場において遊走した fibroblast がヘモグロビンによって活性化され, uPA 活性を亢進させることを報告している. 本研究では培養ヒト滑膜細胞およびウサギ膝関節を用いて赤血球成分であるヘモグロビンによる MMP および uPA の発現への影響について検討した. その結果, ヘモグロビン投与群においてヒト滑膜細胞培養液およびウサギ膝関節洗浄液中に著明なゼラチナーゼ活性を認めた. ゼラチナーゼは分子量およびスタンダードとの比較から MMP-9 であると思われた. 酵素活性はヘモグロビンに対し濃度依存性および時間依存性を示した. また, ヘモグロビン低濃度下および投与後短時間でも著明な活性の上昇を認めた. また, ヘモグロビン投与群において著明な線溶活性とくに uPA の上昇が認められた. MMP-9, uPA は直接および間接的に作用し, 軟骨のプロテオグリカンを破壊することが報告されている. これらの結果より, 関節滑膜細胞にヘモグロビン刺激を行うことにより, ゼラチナーゼ活性および線溶活性の上昇を認め, これにより関節構成成分の変性, 破壊が進行することが示唆された.

12. ラット脳スライスにおける細胞内アシドーシス負荷後の PCr 維持機構

柴田江利子¹, 西丸直子¹, 北野敬明², 中村龍彦², 横井功¹ (¹大分医科大学生理学講座第一, ²麻酔科学講座)

脳虚血時にはエネルギー代謝に変化を生ずるとともに, 細胞内 pH の低下が起こることが知られている. 今回我々はラット脳スライスにおいて核磁気共鳴 (NMR) 法を用いて, 炭酸ガス負荷 (10~40%) による細胞内アシドーシス時の, 高エネルギーリン酸の変化について調べた. 更に炭酸ガスアシドーシス負荷ののち回復させ再び同濃度の炭酸ガスを用いて負荷を行なった場合, 脳のエネルギー機構に耐性を生ずるかについて検討した.

炭酸ガス濃度 5% のコントロール状態から高濃度炭酸ガスを負荷した場合, PCr 量の減少が見られたが ATP はほぼ一定に保たれた. 再び 5% へ戻すと PCr 量は回復した. PCr 量は細胞内 pH 6.9 まではほぼ維持されていたが, pH 6.8 以下になると急速に減少した. また細胞内アシドー

シス前負荷時に比べ, 再負荷時では細胞内 pH が下がりにくく PCr 量の減少も抑えられた. 以上の結果から pH 低下に対するエネルギー代謝機構に耐性能力が生じたと考えられる. このことはプロトンポンプや ATP 産生系の活性化による可能性が示唆される.

13. ³¹P-NMR によるラット子宮平滑筋のエネルギー代謝の測定

後藤清美¹, 西田欣広¹, 宮川勇生¹, 柴田江利子², 西丸直子², 横井 功² (¹大分医科大学産科婦人科学講座, ²生理学講座第一)

発情期や非発情期などの性周期における血中エストロゲン量の変動と共に子宮平滑筋の収縮力にも変化を生ずることが知られている. 一方, 卵巣摘出ラットの子宮平滑筋ではエストロゲン投与により RNA や蛋白の増加が起こり, さらに子宮筋の収縮力の増加及びエネルギー代謝の亢進が報告されている. しかし, 生体での発情期・非発情期におけるエネルギー代謝については明らかではない. そこで, ³¹P-NMR を用い, 生理的条件下 (35℃) で, 発情期・非発情期のラット子宮平滑筋の高エネルギー磷酸化合物を測定し, 安静時および収縮時で比較検討した. 高カリウム刺激と PGF_{2α} 投与により収縮負荷を行った. その結果, 安静時非発情期子宮平滑筋における高エネルギー磷酸化合物は, 骨格筋と異なり灌流した生理的に良い状態でもクレアチンリン酸 (PCr) が少ないことが明らかとなった. また, 高カリウム刺激負荷及び PGF_{2α} 投与共に PCr は減少した. 発情期・非発情期を比較すると高カリウム刺激では差は認められなかった. PGF_{2α} 投与では発情期に PCr の減少が大きい傾向が認められた.

14. 家兎腎の機械ならびに化学刺激に対する求心性神経活動の特徴

日田 官¹, 山田陽司¹, 松本哲朗¹, 平川晴久², 林田嘉朗² (産業医科大学¹泌尿器科学, ²応用生理学)

【目的】家兎における, 腎盂内圧上昇ならびに電解質灌流に対する遠心性 (ERNA) および求心性腎神経活動 (ARNA) の特徴を調べた.

【方法】麻酔下の家兎を用い, 通常の動静脈カテーテル挿入後, 尿管より 2 本のカテーテルを挿入し, 左腎神経束に神経活動記録用電極を装着した. ERNA 確認後, 神経記録部位より中枢端を切除し, ARNA を記録した. 1) 一方のカテーテルで圧を測定しながら, 他方のカテーテルより, 生食を注入し, 腎盂内圧を上昇させ ARNA を観察した. 2) 2 本のカテーテルを用い, 電解質溶液 (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) で腎盂内灌流を行い, ARNA を観

察した。3) 対側の腎盂内圧上昇に対するERNAの変化についても観察を行った。

【結果】ARNAは、血圧の変化には反応せず、また心拍に同期した成分もないことを特徴とた。同側腎盂内圧の上昇により、ARNAは圧依存性に増加した。電解質の腎盂内灌流では、KClにより、ARNAは濃度依存性に増加したが、その他の電解質では変化しなかった。また、対側の腎盂内圧の上昇によりERNAは減少した。

【考察】腎盂における内圧や K^+ の変化は、求心性の腎神経線維を介して、対側あるいは同側の腎機能に影響を及ぼすこと示唆された。

15. 破骨細胞に発現する Cl^- 輸送体とそれらの骨吸収への関与

岡本富士雄, 岡部幸司, 鍛冶屋 浩, 福島秀文 (福岡医科大学・細胞分子生物学講座)

目的: 破骨細胞(OC)による骨吸収には Cl^- チャネルCLC7や HCO_3^- - Cl^- 逆輸送体が寄与するとされている。今回、OCに存在する Cl^- 輸送体を検索し、それらの機能阻害による Cl^- 動態の変化が H^+ 分泌、および、骨吸収活性に及ぼす作用を調べ、骨吸収における Cl^- 輸送の重要性を検討した。方法: マウスOCを用い、RT-PCR法にて Cl^- 輸送体mRNAの発現を調べた。また、骨吸収状態のOCを用いて Cl^- 輸送阻害剤の Cl^- チャネル活性、細胞内 Cl^- 濃度とpH、骨吸収活性に対する作用を調べた。結果: OCには新たにCLC3, 4, 5, 6, K^+ - Cl^- 共輸送体(KCC), Na^+ - K^+ -2 Cl^- 共輸送体(NKCC)のmRNAが確認された。骨吸収状態のOCは Cl^- チャネル活性が高く、 Cl^- チャネル阻害剤(NPPB)やKCC阻害剤(DIOA)により、細胞内 Cl^- 濃度が増加し、細胞内pHが低下した。両阻害剤の同時投与は細胞内 Cl^- 濃度とpHに対する作用を増強した。また、NKCC阻害剤(bumetanide)も弱い細胞内pH低下作用を示した。これらの Cl^- 輸送阻害剤は骨吸収を減弱させ、その作用はNPPBとDIOAがbumetanideより強く、NPPBとDIOAの同時投与は骨吸収をほぼ完全に抑制した。考察: 骨吸収には複数の Cl^- 輸送体が関わり、中でもCLCとKCCを介した Cl^- 分泌は H^+ 分泌への寄与が大きく、骨吸収に特に重要と考えられた。

16. 脳室内ニコチン投与によるラット歯肉血流量の変化と脳弓下器官の関与

中村太志, 小野堅太郎, 本田栄子, 稲永清敏 (九州歯科大学生理学)

喫煙は歯周病のリスク因子であるが、その作用機序はよく分かっていない。そこで、喫煙により取り込まれるニコ

チンに着目し、実験を行った。ラット脳室内にニコチンを投与し、口蓋歯肉の血流量を測定した結果、投与により口蓋歯肉の血流量は減少した。血流測定後すぐにラットを灌流固定し、ニコチン投与によって発現したc-fosについて免疫染色を行った。その結果、脳弓下器官(SFO)、室傍核(PVN)、視索上核(SON)にc-fos発現の増加を認めた。さらに、パッチクランプ法によりSFOのニューロンはニコチンに対して濃度依存性に内向き電流を誘発することが分かった。この内向き電流は、 $\alpha 4\beta 2$ 拮抗薬DH β E 100nM, $\alpha 7$ 拮抗薬MLA 10nMにより抑制された。 $\alpha 4$ と $\alpha 7$ のサブユニットの免疫染色の結果、 $\alpha 4$ サブユニットは神経細胞体に、 $\alpha 7$ サブユニットはグリア細胞に存在することが示唆された。SFO単離細胞の I_A 電流の記録とニコチン感受性を調べた結果、PVNやSONに投射すると考えられる大きな I_A 電流を検出するものはニコチンに対し全く反応せず、そうでないものはニコチン誘発性内向き電流を記録した。以上より、喫煙によりとりこまれたニコチンは、SFOに存在するニコチン感受性ニューロンより直接PVNやSONを介さずに末梢血管を収縮させ、歯肉血流量を減少させることが示唆された。このメカニズムにより歯周病が増悪する可能性がある。

17. RANKL/OPGによるヒト乳歯の生理的歯根吸収の調節

福島秀文¹, 鍛冶屋 浩, 高田圭介¹, 岡本富士雄, 岡部幸司 (福岡医科大学・細胞分子生物学, 成長発達歯学¹)

【目的】歯牙交換期における生理的乳歯根吸収は破歯細胞によるといわれているが、その分化や機能調節については不明である。一方、骨リモデリングにおいて、破骨細胞の分化促進因子であるreceptor activator of NF- κ B (RANKL)とその抑制因子であるosteoprotegerin (OPG)の発現バランスが破骨細胞の誘導や骨吸収活性を調節することが知られている。そこで、今回、乳歯の生理的歯根吸収におけるRANKLやOPGの関与について検討した。【方法】治療上抜去された歯牙を供与してもらい、生理的歯根吸収期のヒト乳歯から破歯細胞やperiodontal ligament (PDL)細胞を単離した。RANKLとその受容体であるRANKおよびOPGの破歯細胞とPDL細胞における発現を免疫染色法やRT-PCR法により検討した。RANKL投与によるactin ring形成と吸収窩面積の測定により、吸収活性への効果について検討した。【結果と考察】①吸収期のPDL細胞には、RANKLの強い発現が認められたがOPGの発現は弱かった。一方、非吸収期のPDL細胞では、RANKLの発現はほとんど認められず、OPGの発現は強かった。②ヒト破歯細胞においてRANKの発現が確認で

きた。③RANKLは破菌細胞の吸収能を促進した。以上の結果よりPDLにおけるRANKLとOPGの発現バランスの変化は、破菌細胞の分化・誘導や歯根吸収活性を調節すると考えられた。

18. Infrared receptors responding to endothelin-1

Shin-ichi Terashima and Changjong Moon (Dept. of Physiol., Sch. of Med., Univ. of the Ryukyus, Okinawa, Japan)

Infrared receptors of the crotaline snake are temperature receptors, but recently they have also been found to be chemical receptors which respond to a vasodilator, ethanol (Moon and Terashima, in press). This time we have tested their properties as chemical receptors using a vasoconstrictor, endothelin-1 (ET-1). We used 5 adult infrared-sensitive snakes, *Trimeresurus flavoviridis*, of both sexes anesthetized with isoflurane and immobilized by pancuronium (2 mg/kg, i.m.) with artificial respiration. We recorded single unit responses from the trigeminal ganglion (TG, 3 units) and optic tectum (OT, 2 units) with microelectrodes connected to a conventional recording system. We recorded background discharges (BDG), injected 100 μ M ET-1 in 0.1 ml of snake Ringer solution via the heart, and recorded responses from the TG and OT. ET reduced the BGD after 30 sec and silenced it completely at both sites 50 sec after injection. The silence was summated with heat response caused by hand application or cold response caused by presenting an ice bar. Ringer solution only was injected as a control, but no change in discharge was recorded. In conclusion, the infrared receptors seemed to respond to any adequate stimulus, whether temperature or chemical, via the vasomotor system.

Moon, C. and Terashima, S. Neurosci. Lett. (in press)

19. 個体維持や種族保存に関わるカテゴリー識別の脳内メカニズム

井上貴雄¹, 栗生修司¹, 水野雅晴², 吉村 恵², 長谷川健¹ (¹九州工業大学生命体工学研究科高次脳機能講座, ²九州大学医学研究院統合生理)

種族や性別,あるいは食物と非食物の識別など,生殖一摂食機能の調節に重要な役割を果たすカテゴリー識別の脳内メカニズムを調べる目的で,カテゴリー弁別課題を考案し,アカゲザルを用いて,食物,非食物,雄ザル,雌ザルのいずれかのカテゴリーに属する画像により得られる視覚

情報からそれぞれのカテゴリーを識別できるかを検証した。サルに課せられる試行は数十回程度のブロックによって構成され,そのブロックの期間中は,呈示された画像が,例えば食物といった「一定のカテゴリー」に属するか否かをレバー押しによって判断することが要求される。サルは約8ヶ月の訓練によって,雄ニホンザルvs.雌ニホンザルと食物vs.非食物の識別を85%以上の正答率で課題を遂行できるようになった。また,実際に食べたことや見たことはあるが,弁別課題では使用したことのない新規の画像についても,初回呈示の正答率が食物では84%,雌雄のサルの画像では69%であった。以上の結果から,今回実験に使用したアカゲザルはカテゴリーに基づいて画像を識別し,課題を遂行していることが示唆された。本弁別課題を用い,課題遂行時の神経活動を解析する事により,カテゴリー識別の脳内メカニズムの解明が可能となる。

20. ラット大脳皮質味覚野機械受容ニューロンの構成する機能円柱

小川 尚, 王 曉東 (熊本大学医学部生理学第二講座)

大脳新皮質の基本的情報処理単位は皮質表面に垂直な機能円柱であり,円柱内のニューロンはある刺激受容特性を共有している。視覚野など多くの感覚野で調べられているが,味覚野では機能的円柱の存在さえ知られていない。本実験ではウレタン (1g/kg体重)で麻酔したSD成熟雌ラットを用い,大脳皮質味覚野の存在する島皮質表面に垂直にガラス微小電極を刺入し,50~100 μ m毎にマルチユニットを記録し,ガラス棒による触刺激無鉤ピンセットによる侵害刺激,四基本味および0.1Mグルタミン酸に対する応答と機械刺激に対する受容野をしらべることにより,機能円柱を調べた。受容野で分類した全身型機械受容ニューロンは直径200~300 μ mと最も大きくSIに見られるマクロ円柱と略匹敵する大きさであったが,口腔限局型や口腔口唇型などは直径100 μ m以下で小さかった。全身型受容野円柱は広作動域侵害受容ニューロン群を除くと適刺激によりさらに小さな円柱 (いずれも直径100 μ m以下)に分けることができた。広作動域侵害受容ニューロンの構成する円柱は直径が300 μ mで,略全身型受容野円柱を占める傾向にあった。今回,味覚受容ニューロンは全身型機械受容野ニューロンの中に見られ,かつ連続して記録できたが,2個続けてベスト刺激が一致した例が数回見られ,味覚ニューロンも機能円柱を構成することが示唆された。

21. cAMPによるインスリン分泌経路に関する検討—KATPチャネルKOマウスを用いて—

中崎満浩, 郡山暢之, 橋口 裕, 鄭 忠和 (鹿児島大学

医学部第一内科)

KOラ氏島においては、インクレチンによる細胞内cAMPの上昇はコントロールと同等であるにも関わらず、インスリン分泌は極端に障害されていた。同様の結果がForskolinとIBMXを用いた実験においても認められた。PKC依存性の分泌経路は正常であった。コントロールのインクレチンによるCREBのリン酸化はH89やKT5720で障害されたが、インスリン分泌は影響を受けなかった。KOラ氏島のインクレチンによる分泌障害にはPKA非依存性の経路が関与すると考えられた。

22. 温帯性および熱帯性果実が循環機能に及ぼす影響—冷え症者と正常者の比較—

大和孝子, 青峰正裕 (中村学園大学・栄養科学部)

〔目的〕冷え症は一般に女性に多く、婦人科機能の低下や循環器系および自律神経系の機能と深い関わりがあるとされているが、その原因は未だ定かではない。一般的に温帯性の秋の果実は身体を温め、熱帯・亜熱帯性の果実は身体を冷やすといわれている。そこで本研究ではこれらの果実を用いて末梢の皮膚温、血流量に及ぼす影響について正常者と冷え症者で比較し冷え症の成因を探るとともに、そのような定説の是非をも検討した。〔方法〕被験者は女子大学生14名(年齢20～22歳)で、冷えを自覚しない人を正常群(7名)、冷えを自覚している人を冷え症群(7名)とした。身体を“温める”温帯性の秋の果実として温州みかん、巨峰、梨の3種、身体を“冷やす”熱帯・亜熱帯性の果実としてはパイナップル、マンゴー、ライチを用いた。いずれの果実も室温に対して $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内にしたものをそれぞれ60kcalに統一して摂取させ、摂取前後の手足の皮膚温、血流量を測定した。また、これらの測定は月経後2週間の間で、食事後2時間以上経過し、安静にして椅子に座った状態で行った。〔結果と考察〕温帯性の秋の果実は身体を温め、熱帯性果実は冷やす効果があるといわれているが、本研究で使用した果実に限って言えばそのような傾向はみられなかった。いずれの果実によっても中指皮膚温は上昇し、足甲皮膚温は熱帯性果実により若干低下傾向があった。しかし、冷え症者では果実摂取後の温度変化が正常者より著しい傾向があり、室温により影響を受けやすいことも判明した。以上のことより冷え症者は体温調節機能に何らかの失調をきたしていることが推測された。

23. 細菌の電子伝達フラビン蛋白に含まれる二つのFADの機能

佐藤恭介, 二科安三, 志賀 潔 (熊本大・医・一生理)
哺乳類のミトコンドリアに存在する電子伝達フラビン蛋

白は、補酵素FAD一分子のほかに活性に関与しないAMP一分子を含有している。一方、嫌気性細菌*Megaphaera elsdenii*の電子伝達フラビン蛋白は一分子当たり二分子のFADを含有しAMPは持っていない。この二種の電子伝達フラビン蛋白の機能・構造を比較することにより、哺乳類の蛋白におけるAMPの機能について新たな知見が得られることが期待できる。

*M. elsdenii*の電子伝達フラビン蛋白は、乳酸脱水素酵素およびNADHから電子を受け取り、その電子をアシル-CoA脱水素酵素へ渡すことが知られているが、二つのFADがそれぞれどのように機能分担しているかは明らかでなかった。今回の実験で、まず乳酸脱水素酵素により一方のFAD(FAD-Iと呼ぶ)だけが還元されることが示された。一方NADHではどちらのFADとも還元された。NADHによる滴定では、まずFAD-Iが酸化型から一電子還元型になった後二電子還元型へと変わり、その後ももう一方のFAD(FAD-IIと呼ぶ)が一電子還元型を経ずに二電子還元型へと変わっていった。FAD-Iは他の蛋白と反応する点と一電子形式で還元される点で、哺乳類の蛋白のFADと類似している。一方FAD-IIはNADHのみと反応し二電子形式で還元されるなど独自の性質を示している。

24. 飲水時に認められる昇圧反応と筋交感神経活動の変化について

遠藤 豊¹, 山内克哉¹, 筒井由香¹, 山崎文夫², 佐川寿栄子¹, 白木啓三¹ (¹産業医科大学医学部第2生理, ²産業医科大学産業保健学部臨床病態)

われわれは、飲水に伴い血圧が上昇し、後の血液希釈反応に先行して血液濃縮反応が一過性に起こることを明らかにしている。その昇圧反応の起こる機序は不明であるが、飲水による胃の拡張刺激が主要な因子である可能性がある。加えて飲水時の血圧上昇時に交感神経活動が増加しているのか否かも含めて検討するために、健康成人男子被験者に水500mlの経口飲水あるいは胃チューブを介して胃内へ直接注入し、その間血圧、心拍数(HR)および右側下腿腓骨神経より筋交感神経活動(MSNA)を測定した。経口飲水負荷により平均血圧($+12.6 \pm 2.1 \text{ mmHg}$)、HR($+19.9 \pm 1.7 \text{ beats/min}$)は上昇、MSNAは減少したが(burst rate, $-6.9 \pm 1.3 \text{ bursts/min}$; total activity, $-2606 \pm 491 \text{ U/min}$)、直接胃内への水負荷では有意な変化は認められなかった。飲水に伴う血圧上昇は口腔・咽頭～食道にかけての部位より反射性に惹起されるものであり、胃のファクターは関与しないことが示唆された。

25. In vitro 虚血性神経細胞死を調節する細胞内情報伝達系

田中永一郎, 新山修平, 東 英穂 (久留米大学医学部生理学第一講座)

ラット海馬 CA1 錐体細胞から細胞内記録を行い, 酸素・グルコース除去液を灌流投与 (虚血負荷) すると, 約 5 分後に急峻脱分極電位が発生し, その直後に酸素・グルコースを再投与 (虚血解除) しても, 膜は脱分極し続け 5 分後には 0 mV に達し, 不可逆性変化が生じる. アラキドン酸産生を阻害する phospholipase A₂ 阻害剤である *para*-BPB あるいは *aristolochic acid* を前処置すると, 濃度依存性に虚血解除後に膜電位が回復するニューロンが増加した. アラキドン酸代謝を阻害する cytochrome P-450 阻害剤 17-octadecynoic acid の前処置でも有意な膜電位回復が見られたが, lipoyxygenase 阻害剤 nordihydroguaiaretic acid, 3,4-dihydroxyphenyl ethanol あるいは cyclooxygenase 阻害剤 indomethacin, resveratrol, Dup-697 の前処置では少数のニューロンしか膜電位回復を示さなかった. 一方, free radical scavengers の edaravone および α -tocopherol 前処置で濃度依存性に膜電位が回復した. 以上の結果は, アラキドン酸代謝過程, 特に cytochrome P-450 を介して産生される free radicals が虚血解除後の細胞膜の不可逆性変化発生に主に関与していることを示唆した. また lipoyxygenase および cyclooxygenase を介するアラキドン酸代謝過程も僅少ではあるが膜の不可逆性変化発生に関与すると推察された.

26. 細胞外 cAMP はラット視床下部視索上核での自発性抑制性シナプス入力を抑制する.

野口 淳¹, 芹野良太¹, 梶島成利², 上田陽一¹ (産業医大・医・第1生理¹, 第2内科²)

cAMP は種々の受容体刺激により細胞内で生成される細胞内情報伝達物質で, その一部が細胞外へ排出・流出されることが知られている. しかしながら, 細胞外に存在する cAMP の生体における役割はまだよく分かっていない. これまでに我々は, ラット視床下部視索上核において細胞外 cAMP がエクト型酵素群によりアデノシンに代謝され, 神経分泌細胞のシナプス後膜の膜電位依存性カルシウムチャネルを抑制することを報告しているが, シナプス前膜への作用については依然として不明である. そこで細胞外 cAMP が視索上核の神経分泌細胞のシナプス前膜へ及ぼす作用について, スライスパッチクランプ法を用いて検討した. 細胞外 cAMP は可逆的かつ濃度依存的に自発性抑制性シナプス入力の頻度を抑制したが, 電流の大きさについては有意な変化は認められなかった. この抑制作用はア

デノシン A₁ 受容体阻害薬 (CPT) 投与とエクト型-5'-ヌクレオチダーゼ阻害薬 (RO201724) 投与により解除されたが, エクト型フォスホジエステラーゼ阻害薬 (α , β メチレン ADP) 投与によっては解除されなかった. また AMP 投与によっても同様の抑制作用が生じ, その作用は同濃度の cAMP よりも強かった. 以上の結果より, 細胞外 cAMP は視索上核において, AMP に代謝された後, 抑制性シナプス前膜のアデノシン A₁ 受容体を刺激して神経分泌細胞の電気的活動を修飾することが示唆された.

27. アデノシンは A₁ 受容体活性化により末梢から脊髄後角に至る興奮性シナプス伝達を抑制する

労 力軍, 楊 鯤, 藤田亜美, 熊本栄一 (佐賀医科大学・生体構造機能学講座 (神経生理学))

末梢から脊髄後角に至る痛み情報伝達がアデノシン (Ado) により抑制されることは知られているが詳細は不明である. 我々は以前, Ado が痛み情報伝達制御に重要な役割を果たす膠様質細胞で記録される自発性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) の発生頻度を抑制することを報告した. 今回, 成熟ラットから後根付き脊髄横断スライス標本を作製し, 膠様質細胞にパッチクランプ法を適用して, 後根刺激により誘起される A δ および C 線維刺激誘起単シナプス性 EPSC に対する Ado 作用を調べた. Ado (100 μ M) は調べた細胞 (n = 40) の 65 % で A δ 線維 EPSC の振幅を 38 % だけ可逆的に抑制した. 残りの 15 % では, Ado 存在下で抑制あるいは抑制なしで Ado 除去後一過性の促進 (26 %), さらに残りの 20 % では Ado 作用がみられなかった. C 線維 EPSC については, 調べた細胞 (n = 13) の 69 % で振幅が 41 % だけ可逆的に抑制され, 残りの細胞では Ado 作用はみられなかった. A δ および C 線維 EPSC のいずれにおいても, 同様な抑制作用は A₁ 受容体作動薬 (CPA, 1 μ M) によりみられ, 抑制作用は A₁ 受容体阻害薬 (DPCPX, 1 μ M) 存在下でみられなかった. Ado は神経終末の A₁ 受容体活性化により A δ および C 線維誘起 EPSC を抑制し, その作用は両 EPSC に対して同程度であると結論した.

28. ラット海馬 CA1 ニューロンにおけるアデノシン A₁ 受容体を介した GABA 伝達のシナプセ前抑制

鄭 孝鎮, 張 一成, 赤池紀扶 (九州大学医学研究院細胞システム生理学)

今まで, 成熟ラットのスライス標本で, 海馬 CA1 領域における GABA 遊離はアデノシンにより影響されないことが報告されている. そこで今回, 幼若ラットから機械的に急性単離したニューロン (シナプスブートン標本) を用

いて、自発性GABA遊離に対するアデノシンの効果を検討した。幼若ラットから単離したニューロンでアデノシン(10 μ M)を投与すると、自発性GABA性神経後電流(mIPSCs)のAmplitudeを変化させることなく、頻度を減少させた。アデノシン A_1 受容体の選択的アゴニストである、CPA (1 μ M)においてもアデノシンと同様にmIPSC頻度の有意な減少を認めた。したがって、アデノシンはアデノシン A_1 受容体を介してmIPSC頻度を抑制すること考えられる。一方、生後30日以降の成熟海馬細胞ではmIPSC頻度に対するアデノシンの作用は認められなかった。CPAのmIPSC頻度抑制作用はNEM (10 μ M)存在下と Ca^{2+} -free状態でなくなり、4-AP (100 μ M)あるいは Ba^{2+} (1mM)存在下で、CPAは有意にmIPSC頻度を抑制した。forskolin存在下でCPAのmIPSC頻度抑制作用が認められなかったが、不活性型であるdideoxy-forskolinの存在下では有意にmIPSC頻度を抑制した。また、PKAブロッカーであるRp-cAMPSの存在下でCPAのmIPSC頻度抑制作用はなくなった。これらの結果から、アデノシンはG-蛋白とcoupledしたシナプス前終末の A_1 受容体を活性化し、電位依存性 Ca^{2+} チャンネルからの Ca^{2+} 流入抑制、cAMP-PKA経路の抑制により自発性GABA遊離を調節することが分かった。生理学的に、幼若期ラット海馬の神経細胞において、アデノシン A_1 受容体の活性化は過剰な脱分極性のGABA神経伝達を抑制することによって神経保護作用を示すと考えられる。

29. GABA_B受容体活性による細胞内情報伝達系の調節機構

窪田寿彦, 桂林秀太郎, 村上信哉, 赤池紀扶 (九州大学院・医学研究科・細胞システム生理学)

【目的】神経終末部に存在するGABA_B受容体はGABAの放出を抑制するが、その詳しい細胞内メカニズムは不明な点が多い。本研究では神経終末が多数付着したマイネルト核ニューロンを機械的に単離してシナプスブートン標本を作成し、本ニューロンに投射するGABA作動性神経終末部におけるGABA_B受容体の細胞内メカニズムに関して、セカンドメッセンジャーを中心に調べた。

【結果】1) シナプスブートン標本においてBaclofen (10⁻⁶M)は自発性IPSC (mIPSC)のFrequencyを有意に減少させ、Amplitudeもわずかに減少させた。これらの効果はGABAB受容体拮抗薬のCGP55845A (10⁻⁵M)により消失した。2) GABA_B受容体活性には Ca^{2+} , K^+ チャンネル, $G_{i/o}$ 蛋白が関与している事が判った。3) protein kinase C (PKC)を抑制すると、GABA放出は抑制され、GABA_B受容体活性も認められた。4) GABA_B受容体活性は、

cAMP/protein kinase A (PKA) 経路を介してGABA放出を抑制するが、加えてPKCを抑制してもその抑制効果は認められず、PKCを活性化しても増強作用は認められなかった。さらに、GABA_B受容体活性も認められなかった。

【考察】Meynert細胞におけるGABA_B受容体を介したGABA放出の抑制機構は、神経終末部内のSecond Messengerを介した反応を示すが、PKCは神経終末部からのGABA放出に直接的に作用するよりも、cAMP/PKA経路に対して何らかの作用を持つことが考えられた。

30. 発達期外側上オリブ核神経細胞におけるGABA_Bレセプターの役割

柴田修明 (九州大学大学院・医・細胞システム生理)

外側上オリブ核 (LSO)は聴覚中枢中継核の一つで、同側耳より興奮性の入力に対側耳より抑制性の入力を受け、音源定位の役割をはたしている。このLSOに入力する抑制性入力は発達に伴いGABA作動性成分が減少しグリシン作動性へと変化する。またLSOにおいてはIPSCのLTDの報告があり、これが幼若期にしか起こらずまたGABAB受容体依存性があることの報告がある。我々はLSOにおけるGABAB受容体の発達による変化に注目した。GABAB受容体agonistバクロフェンはIPSCを抑制し、その抑制効果は発達に伴い減少した。またバクロフェンにより惹起されるK電流も発達に伴い減少した。抗GABABR1抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところLSOの神経細胞ではGABAB受容体が発達に伴い減少していることが確認された。LSOにおいては発達期にGABAB受容体によるシグナリングが必要であると考えられる。

31. 5-HTによるラット背外側中隔核ニューロンにおけるシナプス伝達の修飾

松岡稔昌^{1,2}, 蓮尾 博¹, 赤須 崇¹ (久留米大・医・第二生理¹, 精神神経科²)

ラットの背外側中隔核を含む脳スライス標本において、細胞内微小電極法と膜電位固定法を応用してセロトニン(5-HT)の作用を検討した。抑制性シナプス伝達を遮断した状態で、5-HT (1-30 μ M)は誘発性興奮性シナプス後電位/電流 (EPSP/EPSC)を増大した。5-HT₂受容体作用薬 α -Methyl-5-HT (10 μ M)においても同様にEPSPの促進効果を認めた。この5-HTによるEPSPの促進作用は、シナプス前終末部に存在する5-HT_{2A}受容体を介した、シナプス前終末部からの興奮性アミノ酸の放出の増大によることが示唆された。一方、単シナプス性抑制性シナプス後電

流 (IPSC) は、5-HT ($1\text{--}30\ \mu\text{M}$) によって濃度依存性に抑制された。選択的 5-HT_{1B} 受容体作用薬 CP93129 ($10\ \mu\text{M}$) も同様に IPSC を抑制した。選択的 5-HT_{1B} 受容体拮抗薬 SB21664 ($50\ \mu\text{M}$) 存在下で、5-HT による IPSC の抑制作用は遮断された。さらに、5-HT による IPSC の抑制作用は、シナプス前抑制によって起こっていることが示唆された。これらの結果より、ラット背外側中隔核ニューロンにおいて 5-HT は、複数の受容体サブタイプを活性化させることにより、興奮性シナプス伝達を直接、間接的に促進し、興奮性シグナルの情報伝達効率の調整を行っているのではないかと推察される。

32. 各種ヒスタミンレセプターノックアウトマウスの単離線条体細胞における電気生理学的反応

松尾信一郎¹、王 智明¹、渡辺 武²、大津 浩³、渡辺 武彦³、谷内一彦⁴、赤池扶扶¹ (九州大学細胞システム生理学教室¹、九州大学生医研²、東北大学細胞薬理学教室³、東北大学病態薬理学教室⁴)

ヒスタミンは神経伝達物質として、哺乳類の中樞神経において様々な役割を担っている。現在までに明らかになっているものでは、睡眠覚醒、注意、不安、痛みの知覚、水分、体温、食欲など体内バランスの調整に関与していると考えられており、これらの役割を担うレセプターとして現在までに、H1、H2、H3 の 3 種が同定されている。近年、ヒスタミンの各種レセプターの遺伝子情報が解析され、渡辺らの努力によりノックアウトマウスが作成された。それらを用いた研究により H1-KO においては、明期の活動性向上、暗期の活動性の低下、不安度の低下、痛み刺激への反応の鈍化、H2-KO においては胃粘膜の肥大化、血清ガストリンレベルの上昇、H3-KO では暗期における活動性の低下などが報告されているが、それらの電気生理学的な解明はいまだ行われていない。

今回は、各種 KO マウスの線条体単離細胞を用いてヒスタミンの応答の解析を行った。WT マウスでは、過去のラットの実験による報告と同様に、ヒスタミンの濃度により応答の異なる H1、H2 の 2 つのレセプターが観察された。H1、H2 のノックアウトマウスにおいてはそれぞれのターゲットであるレセプターは発現していないことが確認された。また、残ったレセプターの特性には WT の場合と明確な変化を認めなかった。また H1、H2 のいずれもが、K チャンネルを抑制することによって線条体細胞を脱分極していることを明らかにした。

33. 線条体ニューロンにおけるニコチン受容体を介した DARPP-32 リン酸化の解析

浜田美保、西 昭徳、東 英穂 (久留米大学医学部生理学第一講座)

中枢神経系のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は神経前終末に局在し、神経伝達物質の放出を調節する事が報告されている。一方、線条体ニューロン (medium spiny neuron) には、ドーパミンにより制御されるリン酸化蛋白 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa) が選択的に発現している。DARPP-32 の Thr34 残基が PKA によりリン酸化されると PP-1 抑制蛋白として作用する。本研究では、nAChR を介した DARPP-32 の Thr34 残基リン酸化調節をマウス線条体スライスをを用いて検討した。ニコチン ($100\ \mu\text{M}$) は Thr34 残基リン酸化を一過性に促進した。ドーパミン D1 拮抗薬 SCH23390 はニコチンによる一過性のリン酸化上昇を抑制した。nAChR 拮抗薬を用いた解析で、非選択的 nAChR 拮抗薬 mecamylamine、 $\alpha 7$ nAChR 拮抗薬 α -bungarotoxin はニコチンによるリン酸化上昇を完全に抑制した。しかし、 $\alpha 4\beta 2$ nAChR 拮抗薬 DH β E はニコチン作用を部分的にしか抑制しなかった。また、イオン透過型グルタミン酸受容体拮抗薬である MK801、CNQX はニコチンによるリン酸化上昇を抑制した。以上より、 $\alpha 7$ nAChR 活性化によりグルタミン酸が放出され、ドーパミン作動性神経終末において $\alpha 4\beta 2$ nAChR と NMDA/AMPA 受容体が相乗的にドーパミン放出を促進する事、その結果、ドーパミン D1 受容体を介して DARPP-32 リン酸化を促進する事が示唆された。

34. 青斑核ニューロンに対するメチルフェニデートの作用

木谷有里、石松 秀、桑波田 卓、赤須 崇 (久留米大学・医学部・第 2 生理)

中枢神経刺激剤メチルフェニデート (MPH) は注意欠陥/多動性障害 (AD/HD) の症状改善薬で、薬理的にはノルエピネフリン (NE) の放出促進や再取り込み阻害作用が報告されているが、脳細胞の機能に対する研究はほとんどない。そこで我々は、ラット脳スライス標本に細胞内微小電極法およびホールセルパッチクランプ法を応用し、NE 含有神経の主座である青斑核 (LC) ニューロンに対する MPH の作用を電気生理学的に検討した。その結果 MPH は α_2 受容体を介した内向き整流性 K⁺ 電流を活性化させることにより、膜抵抗の減少を伴う緩徐過分極電位を発生させることが示唆された。LC 近傍を電気刺激して得られたシナプス後電位に対する作用を調べたところ、MPH は濃度依存的に slow IPSP の振幅を増大させ、そのタイムコースを延長させたが、EPSP にはほとんど影響を

与えなかった。また spontaneous IPSP の振幅を増大させ、そのタイムコースを延長させる作用も認められた。以上の結果より、MPH は、LC ニューロンにおいて NE の再取込み機構を遮断することにより、細胞膜を過分極させると同時に NE シナプス伝達を増強させた。このことは LC ニューロンの intrinsic activity に NE 再取込み機構が大きく関与していることを示唆している。これらの作用が AD/HD の病態を解明するひとつの手がかりになるものと考えている。

35. イソアワモチ光感受性の神経細胞、光受容細胞における過分極性の光受容器電位の発生メカニズム

後藤 司 (鹿児島大・医・第二生理学 (兼、機器分析センター桜ヶ丘分室))

軟体動物イソアワモチの神経節には光に直接応答する光感受性の神経細胞、即ち眼外の光受容細胞、Ip-2 として A-P-1 が存在する。これらのうち、Ip-2 細胞の過分極性の光受容器電位は光による guanylate cyclase (GC) の活性化によって生成される cGMP と結合した cGMP 作動性の K⁺ チャネルが開くために発生する。一方、A-P-1 細胞は rods に似て、二次メッセンジャー cGMP が光による PDE の活性化によって分解されるために、同じ cGMP 作動性の K⁺ チャネルが閉じて、脱分極性の受容器電位を発生する。従って、Ip-2 の場合、A-P-1 における Gt 型と異なる別の G 蛋白質の共役が示唆された。今回、電圧固定下の光受容器電流を指標にして、G 蛋白質 (Gi/Go) を活性化する mastoparan, GDP-β-S として LY83583 等の効果を調べ、Ip-2 の光情報伝達系を検討した。Ip-2 の光受容器電流は GDP-β-S の投与で抑制された。Ip-2 に対する mastoparan の投与は cGMP 作動性 K⁺ チャネル遮断剤、L-DIL 又は 4-AP に抑えられる保持電流が発生した。Mastoparan によ

って発生する上記電流は、LY83583 を追加投与することで完全に抑えられた。しかし、同じ mastoparan によって A-P-1 の光応答は影響されなかった。以上の結果は Ip-2 の光受容器電流が Gt タイプと異なる G 蛋白質 (例えば Go) と共役した GC の活性化による cGMP の生成を経由して発生することが示唆される。

36. Calmodulin reactivated rundown L-type Ca²⁺ channel in inside-out patch

徐 建軍, Hao Li-Ying, 亀山亜砂子, 蓑部悦子, 亀山正樹 (鹿児島大学 医学部 第二生理学講座)

Calmodulin (CaM) has been implicated in the regulation of L-type Ca²⁺ channel including Ca²⁺-dependent inactivation and facilitation. In this study, the effect of CaM on rundown of Ca²⁺ channel activity was investigated in guinea-pig ventricular myocytes by using inside-out patch clamp technique. RESULT: (1) Ca²⁺ channel activity exhibited rapid rundown after the formation of inside-out patch, exposure of the patch to CaM (20 and 200 U ml⁻¹) together with 3 mM MgATP reactivated the channel activity to 11% and 95% respectively. (2) Removal of ATP or increasing free Ca²⁺ to mM level abolished the effect of CaM, revealing ATP- and Ca²⁺-dependent action of CaM. (3) Replacement of ATP by AMP-PCP, a non-hydrolyzable ATP analogue, almost abolished the effect of CaM. (4) Protein kinase inhibitors did not block the effect of CaM. These results suggest that CaM is an important factor in maintenance of Ca²⁺ channel activity, and this effect is mainly due to the direct action of CaM on the Ca²⁺ channel in this experimental condition.