

第49回中部日本生理学会

会 期：平成14年10月18日（金）～19日（土）

会 場：富山市・富山市民プラザ

当番幹事：富山医科薬科大学・医学部・第二生理学 小野武年

富山医科薬科大学副学長 竹口紀晃

富山医科薬科大学・医学部・第一生理学 西条寿夫

富山医科薬科大学・医学部・行動科学 福田正治

演題数および参加者数とも例年通りであったが、工学、細胞生理学、臓器生理学、神経生理学および行動神経科学等を含む広範囲の領域から若手を中心に演題発表があり、活発な質疑討論が行われた。また、評議員会では、生理学会における現状と展望について活発に意見が交わされ、次年度より評議員以外の参加者も含めた中部生理学会総会として開催されることが了承された。一方、懇親会ならびに親睦テニスでは、研究領域を越えて忌憚なく意見交換が行われ、来年度開催に向けて会員の熱意が感じられた。

来年は、京都大学霊長類研究所の三上章允教授の当番幹事で、愛知県犬山市で開催されることが決定した。

1. 金魚視神経線維の再伸長関連分子の機能評価法の確立—網膜組織片培養法の有用性—

郡山恵樹, 杉谷加代, 松川 通, 加藤 聖 (金沢大学・院医・脳情報分子, CREST)

哺乳類と異なり金魚網膜神経節細胞は、視神経切断時に細胞死に陥ることなく、切断端から突起が伸展し再生する。我々は、金魚視神経再生初期分子として、トランスグルタミナーゼ (TG), レチノール結合タンパク質 (RBP) のクローニングに成功している。今回、*in vitro*における再生初期分子の突起伸長機能を、網膜組織片培養法を用いて評価する方法を確立した。上記分子のcDNAから得たりコンビナントタンパク質を用いて抗体を作製し、培養網膜組織片に添加して神経突起の保有率を評価した。その結果、視神経切断後の培養網膜組織片における突起誘導は各々の抗体で抑制された。また近年、一酸化窒素 (NO) が神経の分化、生存維持関連因子として注目されており、網膜組織片培養法を用いて、NOによる視神経再生作用機構の解析を検討した。その結果、金魚視神経再生時におけるNO-cGMP経路の関与が明らかになった。以上、成熟網膜の組織片培養法は、*in vitro*における軸索再生の程度や突起再伸長関連シグナル分子の解析に非常に有用なモデルであると示唆された。また、*in vivo*での評価も、視蓋におけるHRPトレーシング法により確認した。

2. 画像処理による小型魚類の行動解析システムの開発とその応用

村本健一郎¹, 中川貴志^{1,2,3}, 島崎克仁^{1,2}, 菅原 清^{2,3}, 加藤 聖^{2,3} (¹金沢大・自然研・電子情報, ²金沢大院・医・脳情報分子, ³CREST)

動物行動を観測、解析する場合、それを手動により行うには多くの時間と労力が必要となり、また定量的な観測も困難である。そこで、CCDカメラにより撮影を行い、取り込まれた画像に対してリアルタイムで魚の領域を抽出、2値化し、そのデータを記録する自動観測システムを開発した。従来、金魚を用いて実験を行ってきたが、近年ゲノム科学で注目されているゼブラフィッシュを用いて実験を試みた。しかし、金魚に比べて体が小さく、遊泳速度も非常に速いため、従来のシステムでは撮影が不可能であった。そこで、本研究では撮影における画像解像度とフレームレートを高くするために、魚の領域抽出を高速で行うアルゴリズムを考案した。それにより処理量を約4分の1まで削減することができ、ゼブラフィッシュの撮影および行動解析も可能となった。さらに、稚魚でも分析可能であり、有用なシステムであることが確認された。本システムの応用として、1匹で撮影したときの魚の遊泳軌跡、遊泳速度、および2匹で撮影したときの群れ行動などの定量化を行った。さらにそれらの行動を解析することで発生生物学への応用や神経損傷後の修復度の評価等への応用を試みた。

3. 急性欠神発作ラットの生後発達における転写因子結合活性と脳波および行動異常との関連性についての研究

滝沢 昇, 田中聖之, 加藤 聖 (金沢大院, 医, 脳情報

分子学)

g-Butyrolactone (GBL) によるラットてんかんはヒト欠伸てんかんのモデルと認められている。ヒト欠伸てんかんの発症は幼児期に限局し年齢依存性をもつ。近年このモデルの成熟マウス脳において、てんかん発作急性期に転写因子である cAMP responsive element (CRE), activator protein-1 (AP-1) DNA 結合活性の上昇が報告された。今回我々は転写因子活性における発達期での検討がないことから、幼若期の生後 20 日, 40 日と成熟期の生後 60 日ラットによる GBL 誘発てんかんの行動記録, 脳波記録, CRE, AP-1 DNA 結合活性を測定し比較検討した。GBL 投与後, 行動異常である一点凝視, 行動停止は 3~5 分で, 脳波上の発作波の出現は 5~10 分で認められた。また幼若齢ほど行動異常や脳波異常の出現は低濃度かつ長時間持続した。一方, 成熟期ラットの転写因子活性はマウスと同様に両転写因子とも行動および脳波異常の発症期間と相同して 10~15 分で上昇したが, 幼若期では生後 40 日で初めて 60~90 分と遅れて上昇した。成熟脳では, てんかん発症と関連するようにみえた転写因子活性は発達脳では関連を示さなかった。

4. 生後発達過程におけるラット副嗅球神経興奮の電気生理学および光学的計測による解析

須貝外喜夫¹, 宮澤 徹², 杉谷道男¹, 小野田法彦¹ (金沢医科大学・第一生理, ²耳鼻咽喉科)

成熟ラット副嗅球には少なくとも 3 つの小区分が存在すること, およびモルモット副嗅球と異なり鋤鼻神経層電気刺激に対し著明な oscillation を伴う興奮は誘起されにくいことを以前に発表した。今回, ラット副嗅球の生後発達に伴う神経興奮の変化を, スライス標本を用いて電場電位および光学計測記録により解析した。出生早期 (生後 4~11 日齢, P4~P11) で, ほぼ 3 つの小区分が形成されていたが, 成熟期には見られない 3 ないし 4 波からなる oscillation と 200~300 msec の持続的興奮 (slow response) を伴う電場電位および光応答が観察された。oscillation のサイクル数と周波数は日齢と共に減少し, slow response も成熟期 (P18 以降) にはほぼ消失した。P14~P16 は両者のタイプが混在する移行期であった。

CNQX, APV 投与および無 Mg 液等の一連の結果から, 成熟期 AOB では, non-NMDA 型 Glu 受容体が糸球体での鋤鼻神経線維-僧帽細胞樹状突起間シナプスの興奮伝達に大部分関与し, また, 出生早期においては non-NMDA 型以外に NMDA 型 Glu 受容体も糸球体での興奮伝達に関与し, slow response が発生していることが判った。また, 出生早期の oscillation は, モルモット AOB での機序と同

様に僧帽細胞-顆粒細胞間相反性シナプスで起こっていると推測され, 顆粒細胞樹状突起の NMDA 受容体を介し, 顆粒細胞からの抑制性 GABA 放出を促進させ oscillation の減衰を促していると考えられるが, oscillation は, 成熟期には発生しにくくなるので顆粒細胞からの NMDA 受容体を介する抑制が, 日齢が進むと共に強力になることによるのかもしれない。

5. 発達期大脳皮質ニューロンの Cl⁻トランスポーターによる GABA 応答性調節

山田順子¹, 岡部明仁², 豊田博紀², 福田敦夫^{1,2} (静岡大学・大学院・電子科研, ²浜松医科大学・生理学第一)

GABA は中枢神経系において最も主要な抑制性伝達物質であるが, 幼若時には興奮性として働いている可能性がある。我々はこの原因として, 内向き Cl⁻トランスポーター NKCC1 と外向き Cl⁻トランスポーター KCC2 の作用が発達に伴って変わるため [Cl⁻]_i が変化し GABA_A 受容体を介する GABA 応答性を変えているのではないかと考えた。大脳皮質形成期のラット脳スライス標本を用いて, グラミシジン穿孔パッチクランプ法により GABA 応答を記録し [Cl⁻]_i を計測した結果, GABA に脱分極応答を示す発達初期の細胞では過分局応答を示す成熟細胞に比べ [Cl⁻]_i が有意に高かった。記録終了後細胞質を電極内に吸引し単一細胞における上記 2 種類の Cl⁻トランスポーター mRNA の発現の差を single-cell multiplex RT-PCR 法により解析したところ, [Cl⁻]_i と NKCC1 には正の相関が見られ [Cl⁻]_i と KCC2 には負の相関があることがわかった。また, Ca²⁺ イメージング法を用い GABA 応答性を観察した結果, 発達初期の細胞では GABA により nifedipine 感受性 Ca²⁺ チャネルを介する [Ca²⁺]_i 上昇がみられた。以上の結果より, 幼若期のニューロンでは Cl⁻ホメオスタシスにおいて NKCC1 が主に働き高い [Cl⁻]_i を維持し, GABA の興奮性作用に関与している可能性が示唆された。

6. Freeze lesion 法による大脳 abnormal microgyrus 形成のメカニズム

杉本昌宏¹, 岡部明仁¹, 山田順子², 福田敦夫^{1,2} (浜松医科大学・生理学第一, ²静岡大・院・電子科研)

難治性癲癇の原因として皮質形成異常が注目され, その一つである polymicrogyrus のモデルとして freeze lesion model がある。microgyrus を構成する神経細胞は hyperexcitability を呈する事が示唆されている。我々は, abnormal microgyrus 形成過程の細胞膜特性や Cl⁻ホメオスタシス, 細胞移動に注目した。P0 rat に freeze lesion を行い, P4 から P7 までの脳スライス標本にて whole-cell patch

clamp法により dysplastic cortex の膜特性を計測し、記録終了後細胞質を電極内に吸引し reelin と Cl^- transporter mRNA の発現パターンを single-cell multiplex RT-PCR 法により解析した。また、 Ca^{2+} imaging にて glycine と GABA の反応を計測した。その結果、abnormal microgyrus は幼若性を残した断端周囲の大脳皮質の皮質板細胞が障害部位に移動し V, VI 層を欠いた四層構造の異常皮質にて形成されると考えられた。

7. マウス小腸 ICC の Ca^{2+} 振動における ryanodine 受容体の役割

青山昌広¹、王 靖²、中山晋介²、大矢 進³、今泉祐治³ (¹名古屋大学大学院・医学研究科・呼吸器内科、²同・細胞生理学、³名古屋市立大学大学院薬学研究科・細胞分子薬効解析学研究室)

消化管の ICC の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は、その自発的な電気活動に重要な役割を果たす。本研究では ICC の細胞内 Ca^{2+} 遊離機構について検討した。マウス小腸筋層から細胞小塊標本を作成し、fluo3-AM にて Ca^{2+} 濃度測定を行った。直径数 10~100 μm の標本内に 1~数カ所の自発的 Ca 濃度の変動が観察された (約 18/min)。nifedipine 2 μM 存在下でこの周期的 Ca^{2+} 変動は、2-APB 1~10 μM 投与によりほぼ抑制された。同様に ryanodine 10 μM 投与でも大きく抑制された。caffeine 1~10mM 投与では可逆性にほぼ完全な抑制効果がみられた。筋層標本の免疫蛍光染色では、c-kit 抗体にて network 様の像を、また ryanodine 受容体抗体では筋細胞とともに network 様の像も認められた。単離細胞での RT-PCR では kit 陽性細胞の mRNA から ryanodine 受容体の発現を認めた。これらより ICC の細胞内 Ca^{2+} 遊離機構には IP₃ 受容体とともに ryanodine 受容体も機能的に関与していることが示唆された。

8. ヒト胆嚢上皮の短絡電流に対する トロンボキサンの効果

堀川直樹^{1,2}、酒井秀紀¹、鈴木智之¹、塚田一博²、竹口紀晃¹ (¹富山医科薬科大学・薬学部薬物生理学、²医学部第 2 外科)

当大学附属病院で胆嚢摘出術を施行された患者から、術前に同意を得たうえで摘出標本中の胆嚢粘膜を採取した。胆嚢摘出直後に切開を加え、胆汁を十分に洗い流したのち、粘膜下に 5%ブドウ糖液を注入して粘膜を鈍的に剥離した。これを Ussing chamber (window; 0.13cm²) に装着して短絡電流 (Isc) を測定した。粘膜側溶液に、トロンボキサン A₂ (TXA₂) の安定アナログである STA₂ (1 μM)

を加えると、適用前に比し有意な Isc の上昇を認めた。また粘膜側溶液にプロスタグランジン E₂ (PGE₂; 0.5 μM) を加えても、有意な Isc の上昇を認めた。漿膜側溶液への適用では STA₂、PGE₂ とも Isc の変化は認められなかった。RT-PCR 法により、採取した胆嚢上皮組織に、ヒト TXA₂ リセプター mRNA が発現していることを確認した。これらの結果から、ヒト胆嚢上皮において TXA₂ リセプターおよびプロスタグランジン EP リセプターは、粘膜側に発現している可能性が示唆された。

9. ラット単離大腸粘膜の cAMP 感受性電流に対する クロモノール 293B の効果

内海崇興、酒井秀紀、鈴木智之、竹口紀晃 (富山医科薬科大学・薬学部・薬物生理学)

大腸クリプト細胞には cAMP 依存性 K⁺ チャンネルである KvLQT1 が存在している。クロモノール 293B は、KvLQT1 の阻害剤として知られている。今回我々は、ラット単離大腸粘膜を Ussing chamber に固定し、cAMP 感受性短絡電流に対するクロモノール 293B の効果を検討した。ナイスタチン処理により分泌側膜を膜透過性にした条件下、フォルスコリン (5 μM) は、cAMP 感受性 K⁺ 電流を上昇させた。しかし、クロモノール 293B (1 μM) は、この K⁺ 電流を阻害しなかった。これまでに KvLQT1 が、電気化学的駆動力を形成し、Cl⁻ 分泌の促進しているという報告があるが、この結果からクロモノール 293B が KvLQT1 を阻害し、Cl⁻ 分泌を阻害しているとは考えにくい。次に、漿膜側を膜透過性にした条件下、フォルスコリンによる cAMP 感受性 Cl⁻ 電流に対するクロモノール 293B の効果を検討した。クロモノール 293B は、この Cl⁻ 電流を阻害した。また、カルバコールによる Ca^{2+} 依存性電流をクロモノール 293B は顕著に抑制しなかった。このことからクロモノール 293B は、細胞内の cAMP 依存性経路を選択的に阻害しているものと考えられた。

10. 大腸起電性 Na 吸収のコリン作動性神経による抑制

鈴木裕一、林 久由、山本 武、鈴木知子、尾崎江里子 (静岡県立大学食品栄養科学部生理学研究室)

遠位大腸上皮における、ムスカリン受容体刺激による amiloride 感受性起電性 Na 吸収抑制の細胞内情報伝達機序、特に Ca の関与を検討した。[方法] モルモット大腸粘膜を Ussing chamber に装着し、短絡電流測定を行った。[結果] (1) ionomycin (1 μM , 粘膜側+漿膜側) 投与により、起電性 Na 吸収は 20~30 分後に 73 ± 4% 抑制された。したがって細胞内 Ca 濃度上昇自体が起電性 Na 吸収抑制を引き起こす。次に ionomycin により抑制が起こって

いる条件下での残りの起電性Na吸収に対するCCh投与(0.1 mM)の効果を見たところ, CChにより起電性Na吸収はさらに抑えられた(61 ± 5%; ionomycinなしのコントロール, 73 ± 6%抑制, p = 0.11). (2) 外液(粘膜側 + 漿膜側)の溶液を低Ca溶液(10 mM Mg + BAPTA + ionomycin)にすると, 基線の起電性Na吸収活性は50%ほど抑制された. ここにCCh(0.1 mM)を投与すると起電性Na吸収はさらに抑制された(41 ± 6%; 通常の溶液での抑制, 70 ± 5%, p < 0.05). [考察] 細胞内Caシグナリングが最大限活性化されている, あるいはある程度抑えられている, と考えられる条件下でも, CChによる起電性Na吸収抑制効果は見られること, が示された. 結論: ムスカリン刺激による大腸起電性Na吸収抑制には, 細胞内Ca濃度上昇以外の情報伝達経路も関与する.

11. Volume-dependent ATP-conductive Large-conductance Anion channel (VDACL) and swelling-induced ATP release in neonatal rat cardiomyocytes

Amal K. Dutta, Hiromi Uramoto, Yasunobu Okada and Ravshan Z. Sabirov (Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences)

Hypotonic stimulation activated Volume-dependent ATP-conductive Large-conductance Anion channel (VDACL) in neonatal rat cardiomyocytes in the cell-attached configuration of patch clamp. Under isotonic conditions, cell-attached patches were normally silent, but patch excision led to the activation of currents that consisted of multiple large-conductance unitary steps. The current displayed voltage- and time-dependent inactivation. The voltage-dependent inactivation profile was bell-shaped, with maximum open probability at -20 to 0 mV, similar to C127 cell in our previous study (J Gen Physiol 2001, 118: 251-266; J Physiol 2002, 542: 803-816). The single-channel conductance was app. 400 pS, with linear current-voltage relationship. The channel was anion-selective and exhibited ATP-permeability with P_{ATP}/P_{Cl} of ~0.1. In contrast to C127 mammary cells, cardiac excised patches contained single channel events with unitary conductance of app. half of VDACL size (~250-200 pS). Voltage dependency, anion selectivity and ATP permeability of this channel were similar to VDACL. As was the case in C127 cells, hypotonicity-induced ATP release from cardiac myocytes and VDACL channel activity were inhibited by Gd^{3+} and arachidonic acid, but was insensitive to glibenclamide.

12. Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離によるニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体の感受性増強

西嶋泰洋, 徳納博幸, 久場健司 (名古屋大学大学院医学研究科細胞生理)

培養ラット上頸神経節細胞にパッチクランプ法応用し, アセチルコリン(ACh)の局所灌流により発生した膜電流(ACh電流)を記録し, AChの高濃度の条件投与によるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)感受性の可塑的増強機構を調べた. Krebs液中で低濃度(10 μ M, 1秒)のAChにより誘起したACh電流は, 200 μ MのAChの20秒間投与により, 20例中16例で平均1.70倍に増強した. この時, ACh電流のピーク時間は不変であった. 無 Ca^{2+} 液中で, ACh電流の振幅は約80%に減少し, 高濃度ACh投与によるACh電流の増強効果は顕著に抑制された(39例中18例で平均1.22倍の増強). 更に, EGTA(0.86mM)加えた無 Ca^{2+} 液中では, 高濃度ACh投与によるACh電流増強効果は殆ど消失か逆に抑制効果が見られた(20例中2例でのみ増強, 平均98%). リアノジンの効果を介する Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離を阻害するリアノジン(10 μ M)存在下では, この増強効果は4細胞で見られなかった. 以上の結果から, nAChRを通る Ca^{2+} により Ca^{2+} 誘起性 Ca^{2+} 遊離がリアノジン受容体を介して起こり, これによる細胞内 Ca^{2+} 上昇により Ca^{2+} 依存性の機構が活性化され, nAChRの感受性が増強されることが推察される.

13. 過酸化水素によって誘発されるアポトーシス性とネクローシス性の膜ブレップ

L.F. Barros, 金関 恵, R.Z. Sabirov, 森島 繁, 前野 恵美, 岡田泰伸 (生理学研究所・機能協部門)

膜ブレップの発生は, アポトーシスにもネクローシスにも伴われることが知られているが, 両者の比較が同一細胞で行われたことはない. 今回, HeLa細胞で両ブレップの異同を検討した. 本細胞は H_2O_2 によって20分以内に一過性にブレップを示した後に, 60分以降再びブレップを示した. 早期ブレップは低濃度 H_2O_2 によっても発生し, caspase-3の活性化がその後に伴われ, PI透過性は示さないところからアポトーシス性ブレップと考えられた. これに対して後期ブレップは高濃度 H_2O_2 でしか誘発されず, caspase-3の活性化は伴わず, その細胞は続いてPI核染色を示すのでネクローシス性ブレップと考えられた. 両者の構造はその根元の首の直径が共に約1.1 μ mであるなどの共通性を示した. また, 両者とも汎カスパーゼ阻害剤(z-Ddcb)やカルパイン阻害剤(PD15606)に影響を受けなかった. しかし, p38MAPK阻害剤(SB203580), ROCK-I阻害剤(Y-27632)やMLCK阻害剤(ML-7)によ

って前者のみが抑制されることが明らかとなった。

14. スフィンゴシン-1-リン酸受容体 (S1P₂/EDG5) による低分子量 G 蛋白質 Rac および細胞遊走の抑制をメダイエートする三量体 G 蛋白質

杉本直俊, 多久和典子, 多久和 陽 (金沢大院・医・血管分子生理学)

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は細胞の遊走, 細胞骨格制御, 形態変化, 増殖など多彩な生理活性を示す脂質性成長因子である。S1P 受容体 S1P₁/EDG1 および S1P₃/EDG3 はともに細胞運動の分子スイッチである低分子量 G 蛋白質 Rac を活性化して細胞の遊走を引き起こす。一方, S1P₂/EDG5 はこれとは逆に Rac および細胞遊走の阻害活性を有する最初の三量体 G 蛋白質共役型受容体として我々によって見出された。本研究ではスフィンゴシン-1-リン酸受容体のなかでも S1P₂ のみが特異的に有する Rac 活性および細胞遊走の抑制作用が, どの三量体 G 蛋白質を介して起こるか検討した。三量体 G 蛋白質 α サブユニットを活性化するフッ化アルミニウムは S1P₂/EDG5 発現 CHO 細胞の遊走と Rac 活性化を濃度依存的に抑制した。百日咳毒素処理あるいは G_s, G_i, G_q, G₁₂, G₁₃ の各 α サブユニットの C 末端ペプチドを S1P₂/EDG5 発現 CHO 細胞に発現させると, G α_{12} , G α_{13} の C 末端ペプチドのみがスフィンゴシン-1-リン酸による細胞遊走と Rac 活性の抑制を引き起こした。以上の結果から, S1P₂/EDG5 の細胞遊走抑制作用は G₁₂, G₁₃ を介すると結論される。

15. Plasminogen Activator Inhibitor-1 による腫瘍細胞の遊走促進作用

高橋 毅², 井原勇人¹, 鈴木優子¹, 最上秀夫¹, 浦野哲盟¹ (¹浜松医科大学・第二生理, ²第一外科)

【目的】 Urokinase-type plasminogen activator (uPA) は plasminogen に作用し plasmin を生成することにより, 細胞外基質の分解に作用し, 腫瘍の浸潤を促進すると考えられる。しかし, plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 は uPA の特異的インヒビターであるにもかかわらず, 悪性疾患の予後不良因子とされる。一方, PAI-2 は予後良好因子という報告もある。そこで悪性細胞の接着能, 遊走能に対する PAI-1 及び PAI-2 の関わりを検討した。

【方法】 Vitronectin (Vn) 及び^β collagen type IV (Col) でコートした plate に human fibrosarcoma cell (HT-1080) を PAI-1 及び PAI-2 の存在下で 1 時間培養し, 細胞の接着能を評価した。また, 遊走能を測定では Cell Culture Inserts のフィルター上面を Vn で, 下面を Vn または Col で加工し, HT-1080 細胞を PAI-1, PAI-2 と共に 6 時間培養

しフィルター下面に移動した細胞数を計測した。

【結果】 PAI-1 は HT-1080 細胞の Vn への接着能を濃度依存性に抑制したが (1-100nM ; 60% inhibition at 100nM), Col への接着能には影響を及ぼさなかった。Cell Culture Inserts を用いた遊走能の測定では, PAI-1 は Vn から Vn への遊走を抑制したが, 逆に, Vn から Col への遊走を濃度依存性に促進させた (1-100nM ; 300% increase at 100nM)。また, PAI-2 は HT-1080 細胞の接着, 遊走には影響を及ぼさなかった。

【考察】 PAI-1 は HT-1080 細胞と Vn との親和性を低下させることによって, HT-1080 細胞の Vn から Col への遊走を促進していると考えられた。PAI-1 が悪性腫瘍の原発巣からの遊離を促し, 遠隔転移をきたすメカニズムに関与している可能性が示唆された。

16. エヴァネセント蛍光顕微鏡を用いたインスリン分泌機構の解析: グルコース刺激によるプロテインキナーゼ C の活性化機構

最上秀夫¹, 鈴木優子¹, 渡部香織¹, 小島 至², 浦野哲盟¹ (¹浜松医大・生理学, ²群馬大学生体調節研究所・細胞調節)

真核細胞に存在する多くのプロテインキナーゼ中で, プロテインキナーゼ C (PKC) は最も詳細に研究されている酵素群のひとつである。現在では, PKC はシナプスの可塑性, 神経及び内分泌そして外分泌細胞からの開口放出機構, 筋収縮, 細胞の増殖, 分化など広範な細胞機能の調節に関与していることがわかっている。PKC は一次構造の調節ドメイン違いにより大きく 3 つのカテゴリーに分類される。そのうち, conventional PKC (cPKC) と novel PKC (nPKC) はジアシルグリセロール (DG) 結合部位を持ち, cPKC はさらに Ca²⁺ 結合部位も持つ。この構造上の違いから cPKC は Ca²⁺ と DG により, nPKC は Ca²⁺ 非依存性に DG のみによって活性化される。グルコース刺激によるインスリン分泌においても PKC が関与していると考えられているが見解の一致を見ていないのが現状である。最近, 我々は PKC α -GFP と PKC θ -GFP を probe として, 高カリウム脱分極刺激による電位依存性 Ca²⁺ チャネルを介した Ca²⁺ 流入が cPKC だけでなく nPKC を活性化させることを見出した。この知見を踏まえて, より生理的なグルコース刺激により PKC が活性化されるかどうかエヴァネセント蛍光顕微鏡を用いて検討した。

17. 中脳神経前駆細胞の細胞周期抑制による神経分化促進作用

金 へ亭, 飛田秀樹, 鄭 且均, 西野仁雄 (名古屋市立

大学・大学院・脳神経生理学)

神経幹(前駆)細胞の細胞周期の制御により神経幹細胞を神経へ分化誘導させることが可能かどうかについて検討したので報告する。中脳由来神経幹細胞は、E12.5ラット中脳腹側部よりえた細胞をbFGF存在下無血清培地で浮遊培養することにより調整した。神経幹細胞に細胞周期抑制剤(L-Mimosine, Deferoxamine, Aphidicolin)を処理し、細胞毒性およびその効果を調べた。その結果、L-Mimosine, Deferoxamine, Aphidicolinは細胞毒性を示すことなく、神経幹細胞をG1期に停止させることがBrdU取り込み実験およびFACSscan法により明らかになった。神経幹細胞にL-Mimosine (100 μ M), Deferoxamine (0.5 mM), Aphidicolin (0.5 μ g/ml)を8時間処理し、1%血清にて分化誘導させたところ、細胞周期抑制剤の非処理群に比べ β -tubulinIII陽性細胞数が約2倍増加した。一方、細胞周期抑制剤の処理によってTUNEL陽性となるアポトーシス細胞の増加は特にみられなかった。この結果から、細胞周期抑制剤処理により神経幹細胞は細胞周期のG1期にとどまり、分化誘導刺激により神経細胞への分化がより促進されることが明らかになった。

18. ES細胞由来の神経幹細胞からドパミン神経への分化に対するpleiotrophinの効果

鄭 且均¹, 飛田秀樹¹, 中平健祐², 金 へ亭¹, 池中心裕², 西野仁雄¹ (¹名古屋市立大学・大学院・医学研究科・脳神経生理学, ²生理研・神経情報)

神経幹細胞(神経前駆細胞)から神経細胞への分化・誘導機構を明らかにするため、先ずマウス胎仔(E12)中脳腹側部の神経幹細胞の遺伝子発現ファイルを用いて調べた。15,815個のtagを解析し、神経幹細胞の遺伝子ファイルを作成することができた。その中でpleiotrophin (PTN)の発現が上位に位置していた。ES細胞由来神経幹細胞からドパミン神経への分化に対するPTNの効果を調べた。ES細胞由来の神経幹細胞はEBsを経て調整した。これをbFGF存在下で増殖させた後(増殖期)、bFGFを除いてさらに10日間培養することによりドパミン神経細胞に分化させた。PTNあるいはShhは増殖期に処理した。PTNを処理することによりTH陽性細胞数は約2.5倍に増加と共にnurr1の発現が増加した。HPLCの結果、PTN処理によってl-dopa産生量は増加し、その効果はShhと同程度であった。これらの結果は、PTNは神経幹細胞からドパミン神経への分化(あるいは生存)を促進することを示唆する。

19. Melatonin投与による視交叉上核と室旁核のArg-vasopressin (AVP)とAVP mRNAの変化および松果体の時計関連遺伝子の変動

磯部芳明, 西野仁雄(名古屋市立大学大学院・医学研究科・脳神経生理)

哺乳動物の主たる生物時計の視交叉上核(SCN)からの時刻情報の出力にはArg-vasopressin (AVP)含有神経が関与しており、室旁核(PVN)を経由するのが主経路である。一方、松果体(従属時計)から分泌されるMelatonin (Mel)はSCNからのAVP分泌を抑制する。そこで明期または暗期でのMel (1 mg/kg, i.p.)投与後の時計遺伝子rPer2のmRNAとAVP含量、AVP mRNAの変化をSCNとPVNで、松果体でrPer2, rBmal1, rIcer(転写調節因子)及びN-acetyltransferase (NAT)のmRNAの変動を検討した。各mRNAは同一サンプルから得られたRNAにつきRT-PCRで定量した。rPer2はSCNでは明期と暗期ともにMel投与後3時間目で上昇しPVNでは明期で減少、暗期で増加した。また松果体ではrPer2 mRNAは明期と暗期で増加し、NAT mRNAは明期にだけ増加した。AVPはPVNでは明期、暗期共に変化しなかった。松果体でのNAT mRNAの挙動の明期と暗期でのMelの効果の違いはPVNでのPer2の変動に差があることが原因の一つであると考えた。

20. 過度な水泳負荷ストレスによりラット海馬に出現するdark neuronとその経過

石田和人^{1,3}, 清水秀夫², 飛田秀樹¹, 西野仁雄¹ (¹名古屋市立大学・医・脳神経生理学, ²共同研究教育センター, ³名大・医・保健学科)

Argyrophil dark neuron (DN)はニューロン障害の初期像(細胞骨格の障害)であるとされる。種々の原因が想定されるが、過度な水泳負荷ストレスによっても出現する。本研究では、ラットに3時間の水泳負荷ストレス(水深: 45 cm, 水温: 35°C)を与え、直後~1週後、麻酔下で還流固定し、DN染色、Caspase-3免疫染色(Casp-3)、およびTUNEL染色に供した。また、水泳直後DN染色切片を電顕で観察した。水泳直後、50%の個体でDNは海馬に出現した。DNは、錐体細胞層CA1~CA3に数多く出現したがその色は薄かった(茶褐色)。このDNは、3日後には出現しなかった。また1~3日後、細胞死のマーカーであるCasp-3陽性細胞を認めるものもあったが、殆どの個体ではCasp-3は陰性であり、TUNEL陽性細胞は見られなかった。水泳直後のDN電顕像では、細胞小器官の空胞化が目立ち、ミトコンドリアへの強い銀粒子の付着が認められた。以上より、水泳負荷ストレスにより出現するDN

は、ミトコンドリア障害を含めたニューロンの初期障害像を反映するが細胞死に至るほどのものではないことが示された。

21. Functional differences between face neurons within the anterior superior temporal sulcus of macaque monkeys.

W.C. De Souza, S. Eifuku, R. Tamura, H. Nishijo, and T. Ono (Dept. Physiology, Toyama Med. and Pharmaceu. Univ., Toyama, Japan)

Face neurons in the anterior superior temporal sulcus (STS) showed tuning to face views and/or gaze directions. Previous studies have shown that the anatomical connectivity was different between the rostral and caudal parts of the anterior STS. The rostral part of the lower bank of the anterior STS receives inputs from the anterior inferior temporal gyrus (ITG), while the caudal part receives inputs not only from the posterior ITG but also from the intraparietal sulcus (IPS), posterior parahippocampal gyri, and area V4. We recorded neural activities of the monkey anterior STS during a task that required identification of the familiar persons, who took care of the subjects, by face and studied the characteristics of face neurons that were different along the rostral-caudal axis: many face neurons in the caudal part of the anterior STS optimally responded to front view or profiles. This region also included a number of face neurons that had the response tuning curve symmetrical across the midline (0 degree) like the mirror images (mirror image responses). On the other hand, the face neurons in the rostral part of the anterior STS responded more favorably to a unique 45degree (3/4 view). Modulation of face neuron response by gaze direction in faces was clear in the rostral part in comparison with the caudal part. Psychological studies showed that 45-degree view is special; it gave human subjects the best performance for recognition of face identity. The results suggest a possibility that the discrepancy between psychological and physiological studies on the canonical views of faces may be unfounded.

22. Accumbens neural response to anticipation of reward associated with place changed in dopamine D2 receptor-knockout mice

Anh Hai Tran³, Ryoji Tamura¹, Teruko Uwano¹, Tsuneyuki Kobayashi³, Motoya Katsuki², Gen Matsumoto³

and Taketoshi Ono^{1*} (¹Department of Physiology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-0194; ²National Institute for Basic Biology, Okazaki National Research Institute, Okazaki 444-8585, Aichi; ³Brainway Group, Brain Science Institute, RIKEN, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

Rewarding stimuli can be crucial determinants of future behavior, and prediction of on-going events such as rewards that is useful for survival of an organism involved dopaminergic activities. The nucleus accumbens (NAc), a brain structure has been dubbed as limbic/motor interface, receives dense dopamine-innervation and extensive limbic and cortical inputs. In the present study, we examined the specific role of dopamine D2 receptor (D2R) in mediating associative learning, in regulating NAc neural responses and locomotor activity, using knockout (KO) mice. We trained and recorded the performance of D2R-KO mice and their wild-type (WT) littermates in several spatial tasks in an open field, using intracranial self-stimulation (ICSS) as rewards. Neural activities were recorded from the NAc of the D2R-KO and WT mice, when they performed random reward place search (RRPS), and place learning (PL) tasks. D2R-KO mice displayed reduced locomotor activity and slower acquisition of the PL task without changes in self-stimulation behavior. D2R-KO eradicated the pre-reward inhibitory response of neurons in the NAc, while it increased the number of neurons with place-related activity and the size of place fields. These results provide new evidence that D2R in the NAc involves in ciphering for a specific type of neural response to incentive contingencies.

23. MRI 撮像音強度の変化に伴う一次聴覚野の賦活

岡田知久, 本田 学, 定藤規弘 (生理学研究所・心理生理)

音刺激の断続にともなう神経活動領域を人間において機能的MRIにより描出することを目的として、機能的MRI撮影時に騒音の主要発生源となる傾斜磁場を一時的に止めることにより聴覚入力を変化させ、これに伴う脳血流の増大領域を画像化した。実験1では健聴成人14人を対象とした。13~17秒ごとに1秒間傾斜磁場を止めた(OFF)ところ、全例、一次を含む両側聴覚野にOFFに同期した広範な賦活を認めた。この反応が、聴覚入力の減弱、あるいは増加に伴うものかを解析するために、追加実験を行った。実験1に参加した者のうち11人が参加した実験2では、

12～15秒ごとに5秒間傾斜磁場を止めて、これに引き続いて一次聴覚野で起こった血流変化を、実験1で得られたOFFに対する応答曲線を用いて解析した。5秒間のOFF期間に伴う血流変化は、ON to OFFとOFF to ONの2つの変化時点に同期した応答曲線の線形和により平均90%以上が説明された。すなわち一次聴覚野は新たな刺激入力が生じた場合 (OFF to ON) のみでなく、それが減少した場合 (ON to OFF) にも、その変化に同期した、定常状態よりも大きな賦活を示すことが判明した。

24. 欧州産モノアラガイの平衡胞有毛細胞のK⁺電流特性

奥田 太¹, 孟紅旭² (東海大学大学院 開発工・生物工,²医・生理)

欧州産モノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) は光を条件刺激 (conditioned stimulus), 振動を無条件刺激 (unconditioned stimulus) する組刺激によって、古典的条件付け (連合学習) が可能である (Sakakibara et al. 1998)。光、振動連合学習は光受容器である視細胞と振動を検出する平衡胞有毛細胞の神経節内投射が明らかにされ、また、有毛細胞において光応答が観察された。これらの実験事実から、条件刺激情報 (視覚情報) は少なくとも平衡胞有毛細胞において無条件刺激情報と統合されると考えられている (Sakakibara et al. 2002)。連合学習の神経機序を解析する基礎として、有毛細胞の電気特性を明らかにすることを目的として、今回有毛細胞のK⁺電流特性を検討した。体長約20mmのモノアラガイ成体から中枢神経系を摘出後、平衡胞を単離して顕微鏡下で有毛細胞を同定した。有毛細胞は中央耳石を取り囲むように12個ある。これら有毛細胞の静止膜電位は $-55.1 \pm 10.1\text{mV}$ ($n = 22$) であった。本解析ではそれらの区別はせずに、有毛細胞をナトリウム非存在下でパッチクランプ法によりホールセル・クランプした。その結果、1) 4AP感受性のA電流 (I_A), 2) 遅延性整流電流 ($I_{K\text{-delay}}$), 3) Ca²⁺依存性K⁺電流 (I_{CaK}) の3種類のK⁺電流を確認した。A型電流の電圧依存性と時間依存性を明らかにした。

25. Polycystin-Lチャンネルの分子生物学的、電気生理学的機能解析

山田和徳^{1,3}, 野村英樹², 五日市友子¹, 森恵美子¹, 斉藤久美子¹, 紺井一郎³, 馬淵 宏³, 扶間章博¹, 森 泰生¹ (岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター,²金沢大学医学部付属病院・総合診療部,³金沢大学大学院・血管分子遺伝学)

多発性嚢胞腎の原因遺伝子としてPKD1, PKD2が、ま

た、PKD関連遺伝子としてPKDL, PKDL2, PKD1Lがクローニングされている。PKD2, PKDLの遺伝子産物であるPolycystin-2, Polycystin-L (PCL) は、TRP family, 電位依存性カルシウムチャンネルと相同性を有する。しかしながらその生理的機能はまだ明らかとなっていない。今回我々は、PCLをHEK293細胞に発現させ、分子生物学的、電気生理学的手法を用いPCLの機能を解析した。PCLは強い電位依存性を示すカルシウム透過型非選択的カチオンチャンネルであることが明らかとなった。また電位センサーと考えられるS4領域の変異体を用いたgating kineticsの解析からも、このことが支持された。さらには腎組織を用いた免疫染色にて、PCLが尿管上皮細胞に発現していることが確認された。このことからPCLは非興奮性細胞である尿管上皮において、ナトリウム再吸収に関与する可能性が示唆された。またPCLは脳にも発現しており、興奮性細胞においても生理的役割を果たしている可能性が考えられた。

26. カエル運動神経終末のβタイプリアノジン受容体によるCa²⁺誘起性Ca²⁺遊離と伝達物質放出促進

久保田正和¹, 王 靖¹, 鈴木慎一¹, 久場健司¹, 成田和彦², 村山 高³, 小川靖男³ (名古屋大学大学院・医学研究科・細胞生理,²川崎医科大学・生理,³順天堂大学・医学部・薬理)

運動神経終末のリアノジン受容体 (RyR) は、カエル抗 α -RyR抗体と抗 β -RyR抗体により染色され、筋繊維は抗 α -RyR抗体と抗 β -RyR抗体により染色された。Ca²⁺イメージング下で、テタヌス刺激 (50 Hz, 15～100発) による終末内Ca²⁺濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇は、RyRの阻害剤であるTMB-8 (10 μ M) により90%に減少したが、この作用はリアノジン投与と反覆テタヌス刺激の前処理により消失した。TMB-8 (10 μ M) は、テタヌス刺激 (50 Hz, 15秒) の反覆による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の最初の急峻成分を90%に、緩徐上昇成分を50%に減少した。リアノジンは、低Ca²⁺, 高Mg²⁺液中で細胞内記録した短いテタヌス刺激 (33 Hz, 15秒) による終板電位 (EPP) の振幅を1/3に減少し、比較的低頻度で長いテタヌス刺激 (10 Hz, 12分) によるEPPの増強効果を消失させた。従って、カエル運動神経終末に β -RyRが存在し、低頻度の神経活動時に、その一部がインパルスによるCa²⁺流入により活性化され、伝達物質の開口放出に関与し、高頻度の活動中には、その多くが反覆したCa²⁺流入によりブライミングされ、CICRが大きく活性化され、顕著に伝達物質の開口放出を促進することが結論される。

27. Amiloride と KB-R7943 による血管平滑筋細胞内遊離 Mg 濃度の低下作用

植谷忠之¹, 中山晋介², 立松 康¹, 松原達昭¹ (¹名古屋大学大学院医学研究科・代謝病態内科学, ²細胞生理学)

血管平滑筋における amiloride と KB-R7943 の細胞内遊離マグネシウム濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) に対する影響を検討した。摘出した豚内頸動脈切片を, 95%酸素・5%二酸化炭素 (32°C) で灌流し, ³¹P NMR にて無機リン, PCr (phosphocreatine), γ -, α - and β -ATP のピークの共鳴周波数を計測することにより, 細胞内 pH, $[Mg^{2+}]_i$ を同時に推定した。

Normal solution で 100 分灌流した時点における $[Mg^{2+}]_i$ は 0.77 ± 0.01 mM だった。

1 mM amiloride を投与すると $[Mg^{2+}]_i$ は 0.75 ± 0.01 mM から 0.66 ± 0.03 mM に減少した ($n = 5$, $p < 0.05$ vs control)。Amiloride を除去した後も $[Mg^{2+}]_i$ は減少し続けた。同時に計測された ATP 濃度, 細胞内 pH の変化は認められなかった。

カルシウム除去溶液の灌流では amiloride の効果は認められなかった。また選択的な Na^+/H^+ exchanger-1 の阻害剤である dimethyl amiloride は $[Mg^{2+}]_i$ に影響しなかった。

Thapsigargin で amiloride による $[Mg^{2+}]_i$ の減少は一部阻害された。

心筋で Na^+/Ca^{2+} exchanger を阻害する KB-R7943 (50 μ M) は, 頸動脈平滑筋において, amiloride と同様に $[Mg^{2+}]_i$ を減少させたが, カルシウム除去溶液中ではこの作用は消失した。Mg 調節機構における Na^+/Ca^{2+} exchanger と Na^+/Mg^{2+} exchanger の関連・類似性について考察する。

28. リスベリドン末梢投与がラット体重変化に及ぼす影響

太田 明¹, 太田深雪³, 森 啓至¹, 中島 昭¹, 金子葉子¹, 藤原健太郎² (¹藤田保健衛生大・医・生理 I, ²内科; ³公立陶生病院神経精神科)

非定型抗精神病薬であるリスベリドン (Ris) の内服による食事摂取量増加と随伴する体重増加という副作用が報告されている。そこで我々は, Ris 投与による体重増加が実験動物においても観察されるか否かを検討した。8 週齢雄ラットに Ris 或いは vehicle を 21 日間皮下注した後, 血清並びに白色及び褐色脂肪組織を採取した。Ris 0.01 mg/kg/day 投与群においては食餌摂取量及び体重増加量は共に vehicle 投与群に比し増加し, Ris 0.1 mg/kg/day 投与群にては食餌摂取量は増加するも体重増加量は変化せず, Ris 1.0 mg/kg/day 投与群にては, 食餌摂取量及び体

重増加量共に低下した。Ris 1.0 mg/kg/day 投与群ラットの褐色脂肪組織における脱共役蛋白 1 mRNA 発現量は他群に比し著明に増加した。4 群間にての血清レプチン濃度の有意な差は認められなかった。Ris 0.01 mg/kg/day 及び 0.1 mg/kg/day 投与による食餌摂取量増加の原因は今回の検討よりは特定されなかったが, Ris 1.0 mg/kg/day 投与ラットにおける体重増加量の低下は, 脱共役蛋白 1 の作用の亢進に由来する可能性が示唆された。

29. 糖尿病モデルマウスにおける HSV-1 誘発性顔面神経麻痺の組織学的検討

木口 淳^{1,2}, 飛田秀樹², 羽藤直人³, 西野仁雄³, 村上信五¹ (¹名古屋市立大学・大学院・耳鼻神経感覚医学, ²脳神経生理学, ³愛媛大学医学部耳鼻咽喉科)

特発性顔面神経麻痺 (ベル麻痺) にはヒト単純ヘルペスウイルス (HSV-1) が関与し, 糖尿病患者にはその発症頻度が高い。糖尿病状態でなぜ顔面神経麻痺発症率が増加するのかを知るため, 糖尿病モデルマウスの HSV-1 誘発性顔面神経麻痺の発症率と組織変化について検討した。糖尿病モデル動物はストレプトゾトシン (100, 150 mg/kg) の腹腔内投与により作製し, HSV-1 (4.5×10^6 pfu/ml) を耳介接種し, 1~2 週後に観察される麻痺を調べた。生後 4-6 週齢に接種した場合には, 正常群で約 37.5% の動物に, 糖尿病群で約 66.7% に一過性顔面神経麻痺が観察された。一方, 通常接種後に麻痺が観察されない生後 8 週齢で, 糖尿病群では 22% に麻痺が観察された。組織学的には, 麻痺時に麻痺側顔面神経核部で神経細胞の浮腫状変化, リンパ球浸潤が観察された。糖尿病群ではこれらの所見が麻痺終了後も観察された。麻痺時の誘発筋電図で糖尿病群で振幅の低下を観察した。これら結果から, 高血糖状態ではより程度の強い組織変化を伴い, ベル麻痺の発症率が高くなることが考えられた。

30. 顎関節症における顎関節滑液中の活性酸素種の検出

富田美穂子¹, 林 知也², 石丸純一³, 村山幸一¹, 根川常夫¹, 松山幸枝¹, 桑田一夫¹, 恵良聖一¹ (¹岐阜大・医・蛋白高次機能学, ²明治鍼灸大・生理学, ³県立岐阜病院・歯科口腔外科)

顎関節症の発症に, メカニカルストレスから発生した活性酸素種 (ROS) の関与が示唆されている。そこで HPLC を用いて顎関節症患者女性 14 名と健康成人女性 8 名の顎関節滑液と血清中のアルブミンの酸化還元状態を比較した。また, ROS の不均化反応を止めるため滑液を強アルカリ溶液と混合させて凍結する pH-jump ESR 法を用いて

患者滑液中のROSを測定した。血清中のアルブミンと比較すると滑液中には酸化型アルブミンの増加がみられ、さらに患者滑液中にはROSによって生じた不可逆的な酸化型アルブミンが上昇していた。また患者滑液において過酸化水素 (H_2O_2) から生じるスーパーオキシド (O_2^-) のESRシグナルが確認でき、その強度は凍結までの時間が長くなるに従って大きくなった。HPLCの結果から、顎関節滑液は血清より酸化状態が強く、患者の関節ではコントロール群よりROS発生が多いことが示唆された。さらにESRの結果から、患者滑液中には O_2^- が存在することが明らかとなり、顎関節症の発症にROSの関与が推測された。

31. アジュバント炎症動物C線維受容体の熱反応閾値低下における神経成長因子 (NGF) の関与について

水村和枝¹, 杉浦健之^{1,2}, 矢島弘毅^{1,3}, 佐藤 純¹ (1名古屋大・環医研・神経性調節分野, ²名古屋市立大・医・麻酔蘇生学, ³名古屋大・医・手の外科)

慢性炎症モデル (アジュバント関節炎ラット) における熱痛覚過敏の機構を解析するため、皮膚-神経標本から記録したC線維侵害受容器および培養後根神経節 (DRG) 細胞の熱反応を調べた。実験にはLewisラット (単一神経記録実験) またはWistarラット (DRG実験) を用い、Freundの完全アジュバントの尾部投与により炎症を惹起した。C線維受容体の熱反応閾値は健常ラットでは $40.7 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ($n = 30$) であったが、炎症動物では $35.2 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ($n = 14$) へと低下していた。また、C線維受容体の細胞体であると考えられているカプサイシン感受性小型DRG細胞からホールセルパッチクランプ法により記録した熱電流の活性化閾値は $42.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ($n = 5$) であったが、炎症動物では $26.2 \pm 2.2^\circ\text{C}$ ($n = 6$) へと低下していた。記録開始前にNGFに対する抗体を培養液に90分間添加しておく、熱電流の活性化閾値は健常動物の閾値に近い値 ($42.3 \pm 1.4^\circ\text{C}$) へと戻った。炎症部位やDRG細胞には多量のNGFが含有されているので、この結果はDRG細胞から放出されたNGFがDRG細胞の熱電流活性化閾値を低下させたものと考えられる。以上より、炎症時にはNGFが痛み受容体の熱反応閾値の低下、しいては熱痛覚過敏に大きな役割を担っていることが示唆された。

32. 脳波および末梢呼吸循環系へ及ぼす鍼刺激の効果

酒井重数^{1,2,3}, 梅野克身^{1,2}, 堀 悦郎^{1,2}, 田渕英一^{1,2}, 小野武年^{1,2}, 西条寿夫^{1,2} (1富山医科薬科大学・生理学, ²科学技術振興事業団, ³サカイ鍼灸院)

臨床的に鍼の刺激量を決定する重要な因子として“鍼のひびき”がある。従来の研究より、心地よいひびきが得ら

れた場合には、放散痛、発汗現象、唾液・涙液分泌過多、血管拡張・収縮、消化器系蠕動運動亢進など多彩な自律神経反応がみられることが報告されている。一方、鍼刺激は、脳波の α および θ 波成分にも影響を及ぼすことが報告されている。しかし、鍼刺激量と自律神経反応および脳波の活動性との関係はほとんど明らかにされていない。本研究では、鍼刺激量と自律神経反応および脳波との関係を明らかにするため、鍼刺激を3~20回反復し、脳波、心拍、および血圧の変化を解析した。被験者として健康成人7名を用い、鍼刺激は右僧帽筋に数回試み、刺激を感じたら被験者にボタンを押すように指示した。また、鍼刺激中の心電図、血圧、および脳波 (国際10-20法) を600秒間A/Dコンバータを介して測定した。その結果、鍼刺激により心拍数 (HR) は 68.7 ± 5.9 (平均値 \pm SEM) から 61.05 ± 4.07 Hzに有意に減少、収縮期血圧 (SBP) は 119.4 ± 2.3 から 130.9 ± 4.9 mmHgに有意に増加した。また、HRおよびSBP変動の変動スペクトル解析により、交感神経活動の指標となる低周波数 (LF) 成分は、安静時ではそれぞれ 0.86 ± 0.3 , および 1.78 ± 1.3 mmHg/Hz²であったが、鍼刺激時によりそれぞれ 0.48 ± 0.20 および 0.75 ± 0.20 mmHg/Hz²に有意に減少した。鍼の刺激回数と、刺激後の心拍変動のHF成分 (副交感神経系) との間に正の相関が、LF/HF比 (交感神経系) との間に負の相関が認められた。一方、鍼刺激中および刺激後において、 θ , α , β , および γ 帯域の脳波のパワー値が増大した。これら脳波のパワー値とHFは正の相関を、LF/HFおよびLFは負の相関を示すことが判明した。以上から、鍼刺激中の高次中枢神経活動と末梢自律神経活動の関連性について考察する。

33. INHALATION OF NATURAL FLAGRANCE “CEDROL” MODIFIED EEGS AND AUTONOMIC ACTIVITY

S. Dayawansa¹, K. Umeno^{1,2}, Y. Nagashima³, H. Oosu³, Y. Yada³, T. Suzuki³, T. Ono^{1,2}, and H. Nishijo^{1,2} (1Dept. Physiology, Fac. Medicine, Toyama Medical & Pharmaceutical Univ.; ²JST, CREST; ³KAO Corporation, Tokyo Research Lab.)

It is well known that odors affect behaviors and autonomic functions. Previous studies reported that some compounds in cedar wood essence induced behavioral changes including sedative effects. In the present study we analyzed autonomic functions and EEGs while subjects were inhaling fumes of pure compound (Cedrol) which was extracted from cedar wood oil. Vaporized Cedrol (14.2 ± 1.7 mg/L, 5 L/min) and blank air (5 L/min) were presented to healthy human subjects ($n=20$) via a

face mask, while ECGs, heart rate (HR), systolic blood pressure (SBP), diastolic BP (DBP), respiratory rate, and EEGs were monitored. Statistical analyses indicated that exposure to Cedrol significantly decreased HR, SBP, and DBP compared to blank air while it increased baroreceptor sensitivity. Furthermore, respiratory rate was reduced while indirect measure of tidal volume was increased during exposure to Cedrol. These results, along with the previous studies reporting close relations between respiratory and cardiovascular functions, suggest that these changes in respiratory functions were consistent with above cardiovascular alterations. Spectral analysis of HR variability indicated an increase in high frequency (HF) component (index of parasympathetic activity), and a decrease in ratio of low frequency to high frequency components (LF/HF) (index of sympathetic activity) during Cedrol inhalation. Furthermore, Cedrol inhalation significantly decreased LF components of both SBP and DBP variability which reflected vasomotor sympathetic activity. In addition, Cedrol inhalation significantly increased slow (α -band) waves in EEGs. Taken together, these patterns of changes in the autonomic parameters and EEGs indicated that Cedrol inhalation induced an increase in parasympathetic activity and a reduction in sympathetic activity, consistent with an idea of a relaxant effect of Cedrol.

34. ラット中脳上丘における脱抑制によるバースト発火生成機構

伊佐 正¹, 遠藤利朗¹, 勝田秀行¹, 李鳳霞¹, 斎藤康彦^{1,2}
(¹岡崎国立共同研究機構・生理学研究所・統合生理研究施設, ²群馬大学・医学部・第二生理)

上丘は視覚対象に眼球や頭部を向ける指向運動の中枢として知られている。上丘の中間層・深層のニューロンは、運動開始前に高頻度のバースト発火をすることが知られている。このバースト発火の生成機構を解析することは行動開始の decision making の過程を理解することにつながる。と考え、ラット上丘スライス標本及び麻酔下ラットを用いて中間・深層ニューロンのバースト発火生成機構を解析した。スライス、麻酔下ラットともに bicuculline 投与によって GABA_A 受容体を抑制すると、中間層ニューロンは視神経刺激に対して長時間 (>1秒) 持続する脱分極応答と高頻度のバースト発火を示した。このバースト発火は NMDA 型受容体を介する上丘中間層の興奮性神経回路の活性化によることが明らかになった。次に bicuculline の投与がどの GABA 作動性システムを抑制したことによるのかを解析した。その結果、中間・深層に存在する GABA ニューロンが視神経刺激または視神経入力を媒介する浅層の刺激に対する中間層ニューロンの興奮性応答に対して feedforward inhibition をかけ、興奮の持続を抑制する機能があり、それを抑制することが長時間持続する脱分極応答とバースト発火を生成させるということが明らかになった。以上の結果は指向運動開始時における上丘ニューロンの脱抑制機構についての新しい知見を与えている。