

第51回中部日本生理学会

日 時：平成16年10月2日（土）10：25～18：30

平成16年10月3日（日）8：30～12：27

会 場：グランシップ（静岡コンベンションアーツセンター）

当番幹事：静岡県立大学 食品栄養科学部 鈴木裕一

静岡県立大学 環境科学研究所 桑原厚和

1. 内包出血モデルラットにおける病態の解析と鉄キレート剤経口投与の影響

○増田 匡，飛田秀樹，西野仁雄（名古屋市立大学大学院・医学研究科・脳神経生理学）

我々は、コラゲナーゼの注入により小さい出血で強い運動機能障害を生じる内包出血モデルラットを確立し、その病態解析と、鉄キレート剤の影響の評価を行った。

出血後の皮質脊髄路ニューロン（CSN）の変性を評価する為、逆行性トレーサのフルオログールド（FG）でCSNを出血前に標識し、出血後の変化を調べた。結果、出血14日後に障害側のCSNの萎縮と減少を認め、軸索損傷による逆行性変性が示唆された。軸索損傷の開始時期を確認する為、コラゲナーゼ処置後早期の組織変化を観察したところ、出血は6時間後から内包部に認められ12時間後まで拡大した。12時間以降は内包の髄鞘染色性の変化を認め、FG及びED1二重陽性の細胞を多数認めた。従って12時間後には髄鞘の変性と軸索の破壊が開始していることが示唆された。脳出血では組織障害への鉄イオンの関与が考えられる為、鉄キレート剤のクリオキノールを経口投与し、出血後の運動機能を判定した。結果、投与群は運動機能の強い改善傾向を示した。

以上より、内包出血モデルは、早期に軸索障害が起こり、それに基づく運動機能障害およびCSNの逆行性変性が生じること、また、鉄キレート剤の早期投与が運動機能改善に有効であることが示された。

2. ラットのアナフィラキシーショックにおける肝臓と腹腔臓器血管床の役割

○崔 森，芝本利重，倉田康孝（金沢医科大学 生理機能制御学）

【目的】アナフィラキシーショックの血圧低下機序の一つとしてイヌのモデルでは静脈抵抗の増大による静脈還流量の低下が指摘されている。ラットにおけるアナフィラキシーショックの血圧低下への肝臓と腹腔臓器血管床の役割を摘出肝と *in vivo* で検討した。【方法】SDラットを *oval-*

bumin で感作し、2週後に実験を行った。摘出肝では門脈から定流量灌流し、灌流液へ抗原を投与した。Double occlusion pressureで類洞圧を測定し、前類洞血管抵抗と後類洞血管抵抗を求めた。*in vivo* では腹腔動脈と腸間膜動脈を結紮後、肝摘除した肝・腹腔臓器血流遮断群と対照群で抗原投与後の血圧低下を比較検討した。【成績】摘出肝では抗原投与により前類洞血管優位の血管収縮と肝重量減少がみられた。*in vivo* の対照群では抗原投与後、門脈圧が上昇し、血圧が低下した。肝・腹腔臓器血流遮断群の血圧低下は対照群より有意に抑制された。【結論】摘出肝の検討からアナフィラキシー時の肝血管収縮は前類洞血管が優位であり、肝血液の駆出が示唆された。*in vivo* の検討から肝血管収縮は門脈圧亢進により消化管などの腹腔臓器の鬱血を惹起し、静脈還流量を減少させてアナフィラキシー血圧低下に関与するものと推察された。

3. 食後の腓血流調節におけるCCKとコリン作動性神経の相互作用

○山本 剛，中島守夫，水野伸匡，石黒 洋，洪 繁，吉川俊之，後藤秀実，成瀬 達（名古屋大学大学院医学系研究科病態修復内科学）

【目的】食後の腓血流の調節におけるCCKと神経の役割を検討した。【方法】犬5頭に脾動脈の腓への分枝に超音波トランジットタイム血流プローブを装着した。無麻酔状態で血流を測定し、腓管より腓液を採取した。CCKの外因性刺激はCCK-8（0, 25, 50, 100, 200ng/kg/h）を静脈内持続投与後、または牛乳を十二指腸内に投与（4ml/分）後、腓血流、腓外分泌および血中CCK濃度を測定した。【結果】CCK-8は、腓血流、血中CCK濃度、蛋白分泌を用量依存性に増加させた。アトロピンはCCK-8（200ng/kg/h）刺激下の腓血流を有意に増加させ、蛋白分泌を抑制した。ヘキサメソニウム（C6）は、CCK-8刺激下の腓血流と蛋白分泌を強く抑制した。十二指腸内牛乳投与により腓血流、蛋白分泌、血中CCK濃度を増加させた。アトロピンは牛乳刺激後の腓血流を増加させたが、蛋白分泌

は抑制した。C6は牛乳投与後の豚血流と蛋白分泌を強く抑制した。血中CCK濃度はアトロピンとC6に影響されなかった。【まとめ】食後の豚血流は、CCKが主にコリン作動性神経を介して調節していると考えられる。

4. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの腸間膜微小循環における誘導型NO合成酵素に由来するNOの役割について

○中山貢一, 石川智久, 河野文香, 川瀬亮介, 山本祐里 (静岡県立大・院薬・分子薬理)

Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病ラットを麻酔下で開腹し、灌流槽に腸を引き出して直径20 μ m前後の腸間膜細動脈の反応性を顕微鏡下で観察した。薬物は灌流液中に投与した。 α_1 作動薬 phenylephrine による収縮反応は、STZラットにおいて有意な増強が示された。また、内皮依存性血管弛緩薬 acetylcholine による弛緩反応は、STZラットにおいて有意な減弱が示された。一方、非選択的NO合成酵素阻害薬L-NNAは、STZラット、対照ラットとも同程度の収縮を惹起した。そこで、iNOS選択的阻害薬S-ethylisothiourea (EIT) による収縮反応を調べたところ、STZラットにおける有意な増強が示された。最後に、免疫組織化学的に腸間膜におけるiNOSの分布を観察したところ、STZラットの腸間膜細動脈のみにiNOSの発現が認められた。以上の結果から、STZ糖尿病ラットの腸間膜細動脈では、 α_1 受容体を介した収縮性の亢進と、血管におけるiNOS発現による内皮由来NO産生減少の相補が生じていることが示唆された。(Ishikawa et al, Br J Pharmacol 2004; 141: 269-276)

5. モルモット胃輪走平滑筋の電気的性質に及ぼすフォルボールエステルの効果

○中村江里, 鈴木 光 (名古屋市立大学大学院 医学研究科 細胞機能制御学)

モルモット胃摘出輪走平滑筋からガラス微小電極を用いて記録される不規則な微小単位電位 (Unitary Potential) や緩やかな脱分極電位 (毎分0.2~3回 Slow Potential) に及ぼすフォルボールエステル (PhE) の効果を調べた。PhEとしてはPDBuを用いた。低濃度 (10^{-9} M) PDBuはSlow Potentialの振幅を変化させずに頻度を増加させ、高濃度 (10^{-7} M) のPDBuはSlow Potentialの発生を停止させた。Chelerythrine (1 μ M, PKCの抑制薬) は低濃度のPDBuによるSlow Potentialの頻度増加作用は抑制したが、高濃度のPDBuによる効果に対しては拮抗できなかった。これらの結果から低濃度のPhEはPKCを活性化させているが、高濃度のPhEは、低濃度とは異なる作用機

序でSlow Potentialを抑制していることが示唆された。アセチルコリン (ACh, 100nM) は静止膜電位を変化させずにSlow Potentialの振幅と頻度を増加させた。PDBuはAChによるSlow Potentialの頻度増加作用を抑制し、高濃度PDBuはAChの作用を消失させた。以上の結果から、低濃度のPhEはPKCを活性化させ、平滑筋の自発活動を増加させるが、AChによる活性化に対しては促進作用をもたらさず、また高濃度のPhEは自発活動にもAChによる興奮作用に対しても抑制的に作用することがわかった。以上のことから胃輪走平滑筋におけるPKCの活性化は自発活動を促進するが、活性化しすぎると却って律動性が失われたり、異なる作用機序により抑制的に作用する可能性が示唆された。

6. モルモット胃平滑筋の自発活動に及ぼすシロスタゾールの効果

中村江里, 橋本綾子, 鬼頭佳彦, 橋谷 光, 森 豊樹, ○鈴木 光 (名古屋市立大学大学院 医学研究科 細胞機能制御学)

モルモット胃平滑筋を摘出し、ガラス微小電極で記録される細胞内電位に及ぼすシロスタゾール (フォスホジエステラーゼ抑制薬) の効果を調べた。筋は緩電位 (slow waves) を律動的に発生しており、シロスタゾールは静止膜電位を変化させることなく緩電位の振幅を抑制したが、頻度や持続時間は変化させなかった。単離輪走筋標本で発生する緩徐電位 (slow potentials) は0.1—10 μ Mシロスタゾールにより濃度依存的に抑制されたので、この薬物は主に輪走筋に対し抑制作用があることが判った。フォスホジエステラーゼ抑制作用を有するカフェインは緩電位の振幅、頻度、持続時間のいずれも抑制した。フォルスコリン (アデニル酸シクラーゼを活性化しcAMPを増加させる) は緩電位の振幅と頻度を抑制したが、持続時間は変えなかった。これらの薬物は縦走筋並びにCajalの間質細胞から記録される誘導電位や歩調とり電位を殆ど変化させなかったが、発生頻度や持続時間はカフェインやフォルスコリンで抑制された。組織中のcAMP量はフォルスコリンと高濃度 (10 μ M) のシロスタゾールにより有意に増加したが、低濃度のシロスタゾール (0.1—1 μ M) やカフェインでは変化しなかった。そこでシロスタゾールによる胃平滑筋の自発活動の抑制はcAMP産生増加とは関連していないと考えた。

7. 豚内頸動脈平滑筋細胞におけるNa⁺依存性・非依存性受動的Mg²⁺経路の研究

○浜口幸久¹, 石井秀樹², 山田高彰², 天野哲也², 今井

健次², 松原達昭³, 室原豊明², 中山晋介¹ (1名古屋大学医学部細胞生理学, ²名古屋大学医学部器官制御内科学, ³愛知学院大学歯学部内科学講座)

細胞内 Mg^{2+} 濃度 ($[Mg^{2+}]_i$) の調節機構として Na^+/Mg^{2+} 交換と, Na^+ 非依存性受動的 Mg^{2+} 経路の存在が推定されているが, 近年発見された transient receptor potential-melastatin subfamily 7 (TRPM7) は, 後者の受動的 Mg^{2+} 経路の蛋白本体と考えられる. またこの TRPM7 が 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) に阻害されるという報告もある (Hermosura et al. 2002). そこで今回の 2-APB を用いて, ³¹P-NMR で $[Mg^{2+}]_i$ を計測し, その調節機構について検討した. 灌流液 ($0Ca^{2+}$) の Na^+ を K^+ 置換して Na^+/Mg^{2+} 交換を抑制すると $[Mg^{2+}]_i$ が増加する. また, K^+ 置換して Mg^{2+} , Ca^{2+} を同時に除去すると $[Mg^{2+}]_i$ が低下する. 以上から血管平滑筋細胞には Na^+ 非依存性受動的 Mg^{2+} 経路が存在し, 更に 2-APB がこの Mg^{2+} 流入・流出を抑制した事からこの経路の蛋白本体が TRPM7 である事が示唆された.

8. MDCK 細胞におけるクローディン-16 の機能発現と会合タンパク質の役割

○五十里 彰¹, 原田 均¹, 出川雅邦², 高木邦明¹ (1静岡県立大学・薬学部・産業衛生学, ²衛生化学)

上皮細胞のタイトジャンクションに発現するクローディン-16 は, 腎臓におけるマグネシウム再吸収に関与すると考えられているが, その機能解析は行われていない. 本研究では, 野生型と PDZ-binding motif を欠失した変異型のクローディン-16 を MDCK 細胞に発現させ, 細胞内分布と二価カチオン輸送機能について検討した.

MDCK 細胞にクローディン-16 を安定発現させ, 免疫沈降法により野生型クローディン-16 が ZO-1 と会合していることを確認した. さらに, 免疫蛍光染色法により, クローディン-16 が ZO-1 とタイトジャンクションに共局在することが明らかになった. 一方, 変異型クローディン-16 は ZO-1 と会合しておらず, 細胞内と側膜に分布した. クローディン-16 の発現により, ⁴⁵Ca²⁺ の管腔側から血管側への輸送量が増加したが, 逆方向は変化しなかった. 管腔側のマグネシウム濃度を増加させると ⁴⁵Ca²⁺ の輸送が阻害された. 以上のことから, クローディン-16 は PDZ-binding motif を介して ZO-1 と結合することによりタイトジャンクションに局在し, カルシウムとマグネシウムを競合的に輸送すると示唆された.

9. ANP は cGMP を介してニホンアマガエル膀胱膜における Na^+ 輸送を促進する

山田敏樹, 松田恒平, 内山 実 (富山大院・理工・生命環境科学)

カエル膀胱膜における ANP ならびに cGMP の Na^+ 輸送作用を器官レベルと細胞レベルで電気生理学的手法により調べた.

膀胱膜において ANP (4.4×10^{-7} M) および 8-Br-cGMP ($> 10^{-4}$ M) は, PD と Isc を有意に増加させた. この応答は, Na^+ free 溶液条件下および amiloride (5×10^{-5} M) 処理により阻害された. また膀胱上皮細胞のホールセル記録において ANP (4.4×10^{-9} M) および 8-Br-cGMP (10^{-4} M) は, 内向き電流を有意に増加させた. この応答は, 細胞外液を Na^+ free 溶液に置換することで阻害された. 以上の結果から, カエル膀胱において ANP は cGMP を介して粘膜側から漿膜側への Na^+ 輸送を促進することが示唆された. この作用機構を解明するため, PKA 阻害剤の H-89 と cGMP-gated channel 阻害剤の spermine で前処理して, cGMP 誘起性 Na^+ 輸送への影響を調べた. H-89 (10^{-4} M) は cGMP 誘起性 Na^+ 輸送を阻害したが, spermine (10^{-4} M) は阻害しなかった.

今回の結果から, ANP は cGMP 濃度の上昇による PKA の活性化を介して Na^+ 輸送を促進する可能性が示唆された.

10. 単離ヒト大腸粘膜における トロンボキササン A_2 -cAMP による塩素イオン分泌機構

○堀川直樹¹, 鈴木智之², 内海崇興², 南村哲司¹, 塚田一博¹, 竹口紀晃², 酒井秀紀² (1富山医薬大・医・第二外科, ²富山医薬大・薬・薬物生理)

本研究では, ヒト単離大腸粘膜を用い, ヒト大腸における TXA_2 の効果と TXA_2 が誘導する細胞内メッセンジャーについて検討した. 手術患者から同意を得て, 摘出標本の一部の正常粘膜を採取し, それを Ussing チェンバーに装着し短絡電流 (I_{sc}) を測定した. TXA_2 の安定アナログ (STA_2) は, 濃度依存的に I_{sc} を上昇させた. STA_2 による I_{sc} 上昇は, フロセミドおよびグリベンクラミドにより抑制されたことから, 主として Cl^- 分泌によるものと考えられた. I_{sc} 上昇は, 特異的 TXA_2 レセプター阻害剤の ONO-3708 により抑制された.

STA_2 の効果は大腸の部位による差がなく, 大腸の各セグメントではほぼ同程度の I_{sc} 上昇が観察された. cAMP 依存性 K^+ チャネルの $K_v7.1$ (K_vLQT1) 阻害剤であるクロマノール 293B は, STA_2 による I_{sc} 上昇を濃度依存的に阻害した ($IC_{50} = 1.2 \mu M$). $K_v7.1$ mRNA およびタンパク質は, ヒト大腸すべてのセグメントに同レベルで発現していた. ホスホジエステラーゼ阻害剤の IBMX は, STA_2 による I_{sc}

上昇を有意に増大させた。またSTA₂は、ヒト大腸ガン培養細胞の細胞内cAMP量を増大させた。以上より、ヒト大腸におけるTXA₂誘発性Cl⁻分泌機構には、cAMP系が介在しているものと考えられた。

11. トロンボキサンA₂が関与するヒト大腸ガン細胞の増殖機構

○酒井秀紀¹、鈴木智之¹、堀川直樹²、鶴飼政志¹、田内克典²、南村哲司²、田淵圭章³、森井孫俊¹、塚田一博²、竹口紀晃¹ (¹富山医薬大・薬・薬物生理、²富山医薬大・医・第二外科、³富山医薬大・生命科学実験センター)

トロンボキサン合成酵素(TXS)は、PGH₂をトロンボキサンA₂(TXA₂)に変換する酵素である。本研究では、TXSおよびTXA₂が大腸ガンに関与するののかについて検討した。当大学倫理委員会の承認のもと附属病院で手術を受ける患者からインフォームドコンセントを得たうえで、手術摘出標本の一部のガン組織と近傍の正常粘膜を採取した。TXSタンパク質は、10例中10例のガン組織で、正常粘膜より高いレベルの発現が認められた。一方、COX-2タンパク質は、10例中5例のガン組織で高発現が認められるにとどまり、TXSの場合に比べて再現性が低かった。ヒト大腸ガン培養細胞(T-84, HT-29, KM12-L4, WiDr)においても、TXSタンパク質の高発現が観察された。KM12-L4細胞に、TXSのアンチセンスオリゴヌクレオチド(TXS-AS)を導入し、TXSタンパク質の発現を抑制すると、細胞増殖が有意に阻害された。TXS阻害剤やTXA₂レセプターアンタゴニストによっても細胞増殖が阻害された。他方、TXA₂の安定アナログ(STA₂)は細胞増殖を促進させた。TXS-ASによる細胞増殖抑制効果は、STA₂を投与することにより消失した。以上の結果から、大腸ガン細胞においてTXSが高発現することにより過剰のTXA₂を細胞外に放出され、TXA₂がオートクリン効果で自身のTXA₂レセプターに結合し、細胞増殖を促進しているものと考えられた。

12. In vitro実験系における小腸粘膜損傷の検討 異なった実験系における小腸粘膜損傷の比較

○稲垣詠子¹、鈴木裕一²、名取靖郎¹ (¹名古屋学芸大学 管理栄養学部、²静岡県立大学 食品栄養科学部)

Ussing chamber法における小腸各部位の粘膜損傷の比較検討を行った。また、酸化阻害剤(アスコルビン酸、DDTC)の粘膜損傷防止効果の検討、反転腸管法での粘膜損傷を比較した。マウスの空腸および回腸を4つ(J1, J2, I1, I2)に分けた。粘膜状態の指標としてグルコース誘発性電位を測定した。実験終了後、組織標本を作製(HE染

色)、組織の状態を観察した。酸化阻害剤はリンゲル液の中に投与した。また反転腸管も同様に行った。J1は2時間後にはグルコース電位は見られなくなり絨毛の融解も進んでいた。4時間後では絨毛部の上皮細胞がほとんどなくなっていた。J2以下は、損傷は軽く、4時間後でもある程度、絨毛はしっかりしているように見え、グルコース電位も見られた。

J1部位について酸化阻害剤を投与したが粘膜損傷が軽減されなかった。標本はDDTC投与によって損傷が軽度になっているように見えた。反転腸管では、グルコース電位の低下は小さく、組織標本の状態もよいように見えた。よって、小腸粘膜組織の損傷は上部ほどひどくなること、J1部位における障害は酸化阻害剤では防止出来ず、反転腸管法では障害は軽度であった。

13. 仙髄背側交連核におけるグリシンとGABAのシナプス小胞への充填速度の差異による共放出(corelease)の出現

○窪田寿彦¹、赤池紀生²、福田敦夫¹ (¹浜松医科大学 生理学第一講座、²熊本保健科学大学 保健科学部 衛生技術学科)

ラットの仙髄背側交連核(SDCN)におけるシナプスではグリシンとGABAはcoreleaseしている。本研究では神経終末が多数付着した状態で機械的に単離したSDCNニューロン(シナプスブートン標本)を用い、グリシンとGABAのcorelease出現様式について調べた。1)抑制性シナプス後電流(mIPSC)に対するglycine受容体拮抗薬のstrychnineあるいはGABA_A受容体拮抗薬のbicucullineの薬理効果から、グリシンあるいはGABAのみの放出とそれらが混合する放出の3種類の放出があることを同定した。2)単一の神経終末部を刺激(focal stimulation)することにより惹起されるシナプス後電流(eIPSC)もmIPSCと同様に3種類の成分を惹起した。3)H⁺/ATPase阻害剤のbafilomycin A1を前処置することでシナプス小胞内のグリシンとGABAを枯渇させ、bafilomycin A1除去後の再充填速度を比較すると、GABAはglycineよりも遅く再充填された。4) bafilomycin A1を全処置することでシナプス後膜側のグリシンならびにGABA受容体の性質に変化は認められなかった。

グリシンとGABAは別々の神経終末部から放出されるだけでなく同一神経終末部からも共放出されるが、1つの神経終末部内にはグリシン単独、GABA単独、それら混合の3種類のシナプス小胞があることが明らかとなった。また、GABAの充填速度はグリシンのそれよりも遅かったことから、3種類のシナプス小胞の形成にはシナプス小胞

周辺部のグリシンとGABAの濃度の差異が関与していることが示唆された。

14. ビデオマイクロスコーピーによる破骨細胞のリン酸カルシウム基質における力学的破壊活動の解析

永房鉄之¹、櫻井孝司²、寺川 進²、星野裕信¹、長野昭¹ (¹浜松医科大学整形外科, ²浜松医科大学光量子医学研究センター)

【目的】破骨細胞の骨吸収活動中における偽足構造の機能については不明である。そこで骨組織類似のリン酸カルシウム (CP) をコートしたカバースリップ上で破骨細胞を培養し、ビデオ顕微鏡法により骨吸収活動中の偽足の動態を解析した。

【方法】日本白色家兎より単離した成熟破骨細胞をCPコート・カバースリップ上で培養し、ビデオ強化型微分干涉 (VEC-DIC) 顕微鏡によるタイムラプス撮影を行い、CP消失領域 (吸収窩) の面積計測、CP断片の追跡、偽足の伸張の観察等を行った。またヒスタミン刺激による破骨細胞の動態と骨吸収能への影響を検討した。

【結果】CP吸収中である破骨細胞では偽足の活発な活動が観察され、カバースリップにコートされたCP粒子を偽足が力学的にはがして細胞体方向へ運搬する様子が記録できた。またヒスタミン刺激により細胞動態は活発化し、吸収窩の形成が増大した。

【結論】CPコート・カバースリップ上で破骨細胞を培養し、ビデオ顕微鏡法を用いた観察から、破骨細胞は偽足を能動的に動かすことにより力学的にも骨破壊活動をすることが示された。またヒスタミンによる骨吸収窩形成への影響が考えられた。

15. in vivo 血小板活性化機構のリアルタイム解析

○林 忠毅、最上秀夫、村上裕介、浦野哲盟 (浜松医科大学 生理学第二)

【背景】血栓形成は障害血管内皮あるいは内皮下組織への血小板の粘着により開始される。粘着血小板は形態変化とともに細胞内カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇がトリガーとなり凝集塊を形成する (血小板血栓)。これを足場として凝固反応が惹起され強固な凝固血栓ができる。凝固系活性化には、血小板内 $[Ca^{2+}]_i$ の持続的上昇による phosphatidylserine (PS) の細胞内膜から外膜への exposure が必須である。我々は、in vivo における血栓形成過程を検討するために、PSの exposure を血小板活性化の指標としてリアルタイム解析を行った。【方法】マウス腸間膜静脈においてレーザー照射により血管内皮細胞を傷害しGFP標識血小板とPSの特異的な結合蛋白である alexa568

標識annexin Vを用いて血小板凝集及びPS exposure を可視化し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。【結果】血小板凝集の増大に伴いGFPの蛍光強度は一端増大したその後急速に減弱した。alexa568の蛍光強度は時間とともに増大した。in vitroの実験でもCaイオノフォアで刺激されたGFP標識血小板においてGFP蛍光強度の急激な減少とalexa568の蛍光強度の経時的な増大が観察された。【考察】GFP蛍光強度の減少は、血小板膜の透過性の亢進によるGFP漏出と考えられた。血管内での凝集塊中の血小板のPS発現は、凝集塊の表層では少なく、深部・中心部を起点として空間的に広がっていたことより、血流速度の関与が示唆された。

16. 生理活性脂質スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) による受容体サブタイプ特異的な細胞遊走・浸潤の制御

多久和典子、有川佳代、山口博紀、杉本直俊、多久和陽 (金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理)

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、血漿中に存在する生理活性リポリン脂質であり、多様な生物活性、特にある種のがん細胞の遊走と浸潤を抑制することが知られていた。近年に至り複数のS1P受容体サブタイプ (Edg1, 3, 5, 6, 8) が同定された。S1Pにより細胞運動と細胞外マトリックス内浸潤が抑制されることが知られているマウスメラノーマB16細胞を用いて、この抑制性制御の分子機構を解析した。B16細胞はS1P受容体のうちEdg5のみを内因性に発現していた。Edg5特異的なアンタゴニストJTE013、優性不活型Rac変異体のアデノウイルスベクター、Rhoを不活化するボツリヌスC3毒素を用いた検討から、B16細胞においてS1Pが内因性Edg5を介してRhoを活性化し、その下流においてRacが抑制されること、Rac抑制がS1Pによる細胞運動と浸潤の抑制作用の重要なシグナルであることが明らかとなった。また、マウス尾静脈からB16細胞を注入し、3週間後に肺転移を調べるin vivo 血行性転移実験系を用い、尾静脈注入前にS1Pで処理することにより、肺転移が容量依存性に抑制されることを見出した。

17. 細胞容積調節に関与する膜伸展刺激活性化カチオンチャネルの性質

○沼田朋大、清水貴浩、岡田泰伸 (生理学研究所・機能協同、総研大・生理科学専攻)

動物細胞は異常浸透圧下での収縮・膨張後にも、速やかに正常容積へと復帰する能力を持つ。Regulatory Volume Decrease (RVD) と呼ばれる容積調節は、膨張時に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起き、それに引き続いてKCl流出と水

流出がもたらされることによって達成される。HeLa細胞にパッチクランプ法を適用し、この際のCa²⁺流入経路として考えられている膜伸展感受性カチオンチャネルの性質を調べ、次の結果を得た。細胞膨張に伴い活性化するホールセルの非選択的カチオン電流成分は、外向整流性であり、Gd³⁺に感受性が示すが、フルフェナミン酸、アミロライドには感受性を示さなかった。インサイドアウト単一チャネル記録で、本チャネルは21pSの単一チャネルコンダクタンス、外向整流性、膜伸展感受性、Gd³⁺感受性を示した。また、fura-2細胞内Ca²⁺測定法で、低浸透圧刺激によって実際にCa²⁺流入が起こり、これはGd³⁺により抑制されることが、そして細胞容積測定によって、低張刺激における細胞膨張後のRVD過程もGd³⁺により抑制されることが判明した。従って、このカチオンチャネルが実際にRVDをトリIGGERするCa²⁺流入経路を与えることが明らかになった。

18. ヒト心筋機械受容チャネル (SAKCA) の電気生理学的解析

○杉村岳俊¹、岸尾正博¹、曾我部正博^{1,2}、成瀬恵治^{1,2,3}
(¹名大・院・医、²ICORP, JST、³名大・高等研究院)

心血管系において、機械受容 (SA) チャネルは重要な生理的役割を担うと考えられている。我々は最近、培養トリ心筋細胞から伸展活性化Ca依存性BKチャネル (SAKCA) をクローニングし、その電気生理学的解析を行ってきた。今回、ヒト心筋からSAKCAチャネルをクローニングしたのでその電気生理学的解析を行った。ヒトSAKCAチャネルはトリSAKCAと高いアミノ酸相同性を示した。cDNAをHEK293細胞に一過的発現させ、パッチクランプ法を用いて、単一チャネル電流の測定を行ったところ、ヒトSAKCAは伸展・電位・Ca²⁺依存性の性質をもつことが判明したが、トリSAKCAとの若干の相違が見られた。ヒトSAKCAチャネル活性化機構に関して細胞骨格の関与を調べた。サイトカラシンD (10 μ M, 7分)を用いてFアクチンを脱重合させたときのヒトSAKCAの伸展活性を調べたがサイトカラシンD処理群と非処理群の間に有意な差は認められなかった。トリSAKCAの活性化の機構にはSTREX配列を介した細胞骨格との結合が重要であることが判明しているので今後、他の細胞骨格脱重合剤などを用いて細胞膜裏打ち骨格などの関与に関して詳細に調べる。

19. 褐色脂肪細胞のCa²⁺応答I: ノルアドレナリン β 作用によるミトコンドリアを介する制御

久場雅子, 須崎 尚, 久場健司 (名古屋学芸大学管理栄

養学部解剖生理)

低温暴露により遊離されるノルアドレナリンの β_1 作用は、褐色脂肪細胞の脂質の β 酸化を起し、ミトコンドリアでの電子伝達を促進し、脱共役蛋白 (UCP) を活性化し、熱発生をする。一方、 α_1 作用は、IP₃によるCa²⁺遊離と容量性Ca²⁺流入により細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i)を一過性に上昇する。本研究では、培養したラット褐色脂肪細胞にCa²⁺イメージング法を応用し、[Ca²⁺]_iに対する β 作用と、 α と β 作用の相互作用を調べた。 α 作用は、急峻に上昇するプラトー相を持つ [Ca²⁺]_i上昇を起し、 β 作用は緩やかな2相性の [Ca²⁺]_i上昇を起す。 β 作用の第1相は、ミトコンドリアの膜電位減少 (ローダミン123蛍光増加)を伴い、脱共役剤である FCCPにより阻害され、第2相は無Ca²⁺、EGTA液中で減少し、pH 9で促進され、無Na⁺液ではあまり影響されない。また、 β 作用による [Ca²⁺]_i上昇中には、サブシガーギンによる [Ca²⁺]_i上昇は見られない。一方、サブシガーギンによる [Ca²⁺]_i上昇中に β 活性剤は [Ca²⁺]_iを減少する。 β 活性剤による [Ca²⁺]_i上昇後には、 α 活性剤による [Ca²⁺]_i上昇は抑制される。又、持続的な α 活性剤の投与中の [Ca²⁺]_i上昇は β 活性剤により減少される。以上の結果から、ノルアドレナリンの β 作用はミトコンドリアからCa²⁺を遊離し、ミトコンドリアと滑面小胞体間のCa²⁺連関により容量性Ca²⁺流入を活性化することが示唆される。

20. 褐色脂肪細胞のCa²⁺応答II: サイロキシンによるノルアドレナリンの作用の修飾

須崎 尚, 久場雅子, 久場健司 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理)

褐色脂肪細胞で、ノルアドレナリンによる β_1 受容体の活性化は、脂質の β 酸化促進と脱共役蛋白 (UCP) 活性化により熱発生をする。一方、 α_1 受容体の活性化は、IP₃によるCa²⁺遊離と容量性Ca²⁺流入を起す。サイロキシンは、細胞内異化作用を促進し、熱発生を亢進する。本研究では、春と初夏のラット (Wister) の培養した褐色脂肪細胞にCa²⁺イメージング法を応用し、ノルアドレナリンの α と β 作用による細胞内Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 制御作用に対するサイロキシンの効果を調べた。春の褐色脂肪細胞では、ノルアドレナリンは、急峻に上昇するプラトー相と遅い2相性の [Ca²⁺]_i上昇を起す。第1相は上述の α 作用により発生し、第2相は β 作用によるミトコンドリアからのCa²⁺遊離とそれに続く容量性Ca²⁺流入による (本学会、久場雅子ら)。サイロキシンの投与 (6~15分間) 10~20分後、ノルアドレナリンの α 作用は抑制され、 β 作用は促進される。一方、初夏の細胞では、サイロキシンの作用下

で、 α 作用によるプラトー相の $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、小さな上昇と一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 減少に変わり、 β 作用による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇も、大きな一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 減少に変わる。以上の結果から、サイロキシンは、ノルアドレナリンの β 作用と協調的に作用し、ノルアドレナリンの作用を β 優位に変換することが示唆される。

21. 褐色脂肪細胞の Ca^{2+} 応答 III：ミトコンドリアと滑面小胞体による容量性 Ca^{2+} 流入の制御

久場健司, 久場雅子, 須崎 尚 (名古屋学芸大学管理栄養学部解剖生理)

滑面小胞体は、 Ca^{2+} の細胞内ストア、緩衝機構、容量性 Ca^{2+} 流入の調節部位として働き、ミトコンドリアは、ATP 産生部位、 Ca^{2+} 緩衝機構として働くが、この2者間での Ca^{2+} 移動が示唆されている。本研究では、ラット褐色脂肪細胞に Ca^{2+} イメージング法を応用し、滑面小胞体とミトコンドリア間の Ca^{2+} 連関と後者による容量性 Ca^{2+} 流入活性化の可能性を検討した。サブシガーギンは、 $[Ca^{2+}]_i$ を緩徐に上昇し、1時間以上持続する。この上昇は無 Ca^{2+} 、EGTA 液により可逆的に消失し、pH 9 により増強され、無 Na^+ 液により影響されない。この時の FCCP の投与は急峻な数10分間の $[Ca^{2+}]_i$ の低下を起す。最初に、FCCP を投与すると、ミトコンドリア内膜の膜電位は一過性に減少し、 $[Ca^{2+}]_i$ は2相性に上昇する。第2相は数10分間持続し、無 Ca^{2+} 、EGTA 液により可逆的に消失し、pH 9 により増強され、無 Na^+ 液では影響されない。この時、サブシガーギンは $[Ca^{2+}]_i$ レベルを変えないか数10分間一過性に減少する。この結果は、ミトコンドリアと滑面小胞体間に Ca^{2+} 移動があり、いずれの Ca^{2+} 濃度減少によっても容量性 Ca^{2+} 流入が活性化され、これは主に細胞膜の Ca^{2+} ポンプにより排出されること、又、容量性 Ca^{2+} 流入の活性化後の更なる Ca^{2+} 遊離処置は容量性 Ca^{2+} 流入を停止することが示唆される。

22. 視神経再生過程における網膜神経節細胞の光応答変化

○渡辺雄太¹, 菅原 清², 村本健一郎¹, 加藤 聖² (¹金沢大院・自然科学・電子情報工学専攻, ²金沢大院・医・脳医科学専攻)

魚類の視神経は切断しても切断端から再伸張し再生する。この視神経再生過程中的網膜内神経節細胞の光応答記録については、Ohらの報告が一例あるにすぎない。この光刺激に対する神経節細胞での応答は、網膜内のネットワークを介して光刺激のパターンが認識された後に、網膜の出力として発火されるものである。それに対して、網膜の

入力側にある水平細胞では、正常時、光刺激に伴ったS電位が見られるが、視神経再生過程中的における光応答記録については全く記載がない。そこで、我々は体長10~15cmのコイを用い、視神経切断後の網膜神経節細胞の光応答をガラス管微小電極で細胞外記録し、さらに網膜内水平細胞の光応答を細胞内記録した。そして、視神経切断後、網膜内のネットワークに変化があるかどうかという点についても検討した。その結果、視神経切断後、水平細胞での光応答は切断前同様の電圧振幅が見られたが、神経節細胞では視神経切断後4~5日に正常時に比べてスパイク発火頻度が著しく減少し、8週目以降徐々に回復してくることを確認した。つまり、視神経切断後において、網膜内ネットワークでの出力側である神経節細胞の機能のみが低下していると考えられる。

23. GAD67-GFPノックインマウスへの子宮内胎仔電気穿孔法により同定した皮質板細胞のGABA_A受容体反応

○古川智範¹, 山田順子², 井上浩一¹, 天野 賢¹, 柳川右千夫³, 福田敦夫^{1,2} (¹浜松医大 生理学第一, ²静大院 電子科研, ³群馬大院 脳神経発達統御学)

脳室帯で発生した細胞は脳表面へ移動し、これにGABAが関与している。GAD67-GFPノックインマウスは、野生型と比べ、ヘテロ変異型は65%、ホモ変異型は7%までGABAの量が減少する。本研究は、このマウスを用い細胞周囲のGABA濃度が発達中の細胞に及ぼす影響を検討した。

ノックインマウスの胎仔(E14)に子宮内穿孔法を用い、脳室帯の細胞を赤色蛍光タンパクで標識し、3日後に胎仔(E17)を摘出し脳スライス標本作製した。CNQX, APV, TTX, CGP55845存在下で、標識されたradial migration細胞に対しホールセルパッチクランプ法を用いGABA電流を記録した。E17の細胞では自発性のGABA電流は認められなかったが、GABA投与により濃度依存的に電流が惹起された。野生型とノックインマウスを比較すると、後者ではEC₅₀が増加する傾向が認められた。

以上の結果より、E17の胎仔はGABA作動性のシナプス形成が少ないが、受容体が発現していることが確認された。また、EC₅₀に違いが見られたことから、細胞周囲のGABAの濃度の違いにより、GABA_A受容体のサブユニットの発現が異なっている可能性が示唆された。

24. 脳型クレアチンキナーゼはK-Cl共輸送体KCC2を活性化する

井上浩一¹, 山田順子², 上野伸哉¹, 福田敦夫^{1,2} (¹浜松医大・医・一生理, ²静岡大院・電子科研)

神経系ではGABAにより活性化されたチャンネルを介しCl⁻が細胞内に流入するため、膜電位は過分極し抑制性にはたらく。しかし、発達期や障害後では比較的 [Cl⁻]_i が高く Cl⁻ が細胞外に出ていくためGABAは興奮性に作用する。この [Cl⁻]_i の変化は、発達期や障害後時間と共に、Cl⁻ を細胞外に汲み出すK-Cl共輸送体KCC2が増加するためである。脳型クレアチンキナーゼ (CKB) は細胞内でKCC2と相互作用しており、今回、その機能的意義を調査した。まず、HEK293細胞にKCC2とCl⁻チャンネルであるグリシン受容体を発現させ、グリシンを投与することにより、KCC2の活性の指標である [Cl⁻]_i を推定できるグリシンの逆転電位 (E_{gly}) をグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いて測定した。その結果、コントロールに比べKCC2のある細胞ではE_{gly}が深くなっており、KCC2はこの系で機能することが示された。次に、この系に dominant-negative CKBを加えたところ、E_{gly}は浅くなった。また、大脳皮質の初代培養細胞を用いた実験においてもこれを支持する結果を得た。これらのことから、CKBはKCC2を活性化することが示唆された。

25. pH感受性GFP変異体を標識したAMPA型グルタミン酸受容体のリアルタイムイメージングによるシナプス後膜発現動態の解析

○茨木京子^{1,2}、西宗敦史¹、M.C.Ashby¹、山本清二²、寺川 進²、J.M.Henley¹ (¹Department of Anatomy, School of Medical Sciences, University of Bristol, ²浜松医科大学光量子医学研究センター 細胞イメージング)

AMPA型グルタミン酸受容体のGluR1が細胞膜上へ発現する現象を可視観察することは、長期増強現象の分子機構解明に重要であると考えられる。本研究では、pH感受性GFP, Superecliptic-pHluorinをGluR1に標識する方法を考案した。このGFP変異体は中性以上で蛍光を発するので、これを標識することにより細胞膜外へ発現したGluR1は中性環境下におかれ蛍光を発すると考えられる。このGFP変異体をGluR1のN末領域cDNAに組み入れたシンドビスウイルスを作成した。海馬分散培養に同ウイルスを感染させると、核以外の細胞体、軸索、樹上突起に広く蛍光が観察され、また受容体中のGFP変異体のpH感受性も保持されていた。そこでNMDA受容体刺激によるLTPとLTDを誘導し、シナプス後膜上のSuperecliptic-pHluorin-GluR1の動態を検討した。

26. 低亜鉛食飼育したマウス海馬におけるニューロンの興奮性増大

○山田浩平、南 彰、長野哲雄¹、鈴木裕一²、武田厚

司、奥 直人 (静岡県立大学薬学部医薬生命化学教室,¹ 東京大学薬学部薬品代謝化学教室,² 静岡県立大学食品栄養科学部生理学研究室)

亜鉛不足による脳の成長や機能に対する影響は十分には明らかにされていない。これまでに、亜鉛摂取不足によりカニン酸で誘発される発作感受性が増大することを示した。

今回、亜鉛不足によるグルタミン酸作動性ニューロンの過剰興奮のメカニズムを検討するために、低亜鉛食飼育したマウスから脳スライスを調製し、海馬における亜鉛動態とカルシウム動態をそれぞれの蛍光プローブを用いて測定した。通常食群と低亜鉛食群の海馬細胞外液の亜鉛動態を検討したところ、低亜鉛食群では苔状線維終末が存在する部位で蛍光強度が低下しており、亜鉛不足によりニューロン終末から放出される亜鉛が減少していることが示唆された。次に、高カリウム溶液で歯状回顆粒細胞を刺激したところ、低亜鉛食群の方がニューロン終末での蛍光強度の増加率が高く、この刺激によりニューロン終末からグルタミン酸が過剰に放出されることが示唆された。また、細胞内カルシウム蛍光強度の増加率も低亜鉛食群で高く、グルタミン酸の過剰放出がさらに示唆された。亜鉛不足によって、細胞内カルシウムホメオスタシスが変化し、グルタミン酸の放出増大が惹起されることが考えられる。

27. 豊かな飼育環境はドパミン欠乏線条体におけるDcx陽性細胞移動を促進する

○浦川 将、飛田秀樹、西野仁雄 (名市大・院・医・脳神経生理学)

側脳室周囲や海馬のニューロン新生は、脳損傷や豊かな環境刺激により増加する。本研究では、線条体のドパミン(DA)欠乏時の細胞新生と移動の変化、及びこれらに対する豊かな飼育環境の効果を検討した。

Wistarラット(雄, P25)を通常あるいは豊かな環境で5週間飼育後、6水酸化DA(6-OHDA: 4.0mg/ml)を線条体に5μl注入した。新生細胞はBrdU(50mg/kg, i.p.)3日間投与により標識後BrdU抗体を用い、新生未成熟神経細胞はdoublecortin(Dcx)抗体で免疫染色を行った。6-OHDA投与一週間後では、1)側脳室周囲のBrdU陽性細胞数に変化はなかった。2)Dcx陽性細胞は線条体内側部と線条体背側部で増加していた。3)Dcx陽性細胞は線条体内側部では多方向へ分枝し、線条体背側部では長い突起をもつものが多かった。4)豊かな飼育環境では、線条体背側部でのDcx陽性細胞の数がより上昇していた。以上の結果から、豊かな飼育環境下では、6-OHDA投与によるDA欠乏後の未成熟神経細胞の移動が促進されることが

示唆された。

28. 痛覚関連培養神経細胞の疼痛物質による興奮と低出力レーザー照射による抑制機構

齊藤大輔, 東 智広, 崎山智之, 紙本雄介, 木村知温, 依田賢太郎, 鈴木和夫 (東海大学開発工学部医用生体工学科)

低出力レーザー照射による鎮痛機構の解明を目的に行った研究で, 神経突起部へのブラジキニン (BK) 刺激による細胞体のスパイクは, 突起部へのレーザー照射で抑制されることを報告したが機構は不明であった。今回, 膜電位, スパイク及びイオンチャネル電流に対するレーザー照射の影響をパッチクランプ法で調べた。7週齢の雄マウスから脊髄神経節を摘出し培養し, 実験には痛覚関連神経細胞である直径 $25\mu\text{m}$ 以下の細胞を使用した。Ga-Al-As半導体 (波長 830nm), 出力 16.2mW , スポット径 $75\mu\text{m}$ のレーザーを用いた。BK刺激による細胞体からのスパイクは, 細胞体へのレーザー照射で抑制され, 照射停止後に回復した。細胞体へのレーザー照射で細胞体は徐々に脱分極した。静止電位から $2\text{--}4\text{mV}$ 脱分極でスパイク頻度は増加し, 更に脱分極するとスパイク発生は抑制された。単一 K^+ チャネルの開口は2分間のレーザー照射で抑制され, レーザー停止後開口は回復した。これらの結果からレーザー照射によるBK誘発スパイクの消失は, K^+ チャネルの開口抑制による脱分極により膜興奮性が失われるためと考えられる。

29. 関節炎ラット後根神経節細胞の冷受容体活性化刺激に対する反応性

太田剛史, 片野坂公明, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所・神経性調節分野)

【目的】アジュバント単関節炎モデルラットでは, 行動学的に冷痛覚過敏が生じており, 感覚神経線維の冷感受性も正常時と比べて増大している。本研究では, 冷痛覚過敏の末梢機構の解明を目的として, 関節炎ラットと健常ラットから脊髄後根神経節細胞 (DRG neuron) を単離培養し, 各種冷受容体活性化刺激に対する応答を比較した。

【実験方法】健常ラット, および足根関節へのCFA注入により作成した単関節炎ラットから, それぞれDRG neuronを単離培養した。両群の細胞に, 冷刺激 ($<10^\circ\text{C}$), Menthol, Mustard Oilを与えた際の細胞内カルシウム濃度変化を, 蛍光カルシウムイメージング法により測定した。

【結果】関節炎群では, 冷感受性細胞の割合が健常群よりも若干低下していた。しかし, 関節炎群では, MO感受性細胞の冷閾値温度が健常群のものよりも高温側にシフトしており, より小さい温度変化で反応する細胞の割合が高

かった。

【考察】炎症時には, MO感受性細胞の冷感受性が高くなることが明らかとなった。MO感受性細胞は, 侵害的冷刺激の受容体であるANKTM1を発現する侵害受容器と考えられていることから, 上記の変化が炎症時の冷痛覚過敏の一因である可能性がある。

30. ラットにおける一過性筋障害をトリガーとした慢性の痛み行動

○橋本辰幸¹, 櫻井博紀¹, 大道裕介¹, 張本浩平¹, 吉本隆彦¹, 江口国博^{1,2}, 山口佳子¹, 熊澤孝朗¹ (¹愛知医科大学医学部痛み学講座, ²愛知学院大学歯学部生理学講座)

末梢組織障害の治癒後に障害とは関連のない部位に持続性疼痛が誘発される。このような病態を慢性痛症と分類しているが未だ決定的な治療法はない。治療法の確立にはモデル動物の開発が重要であるが, 従来のものは神経損傷によるものが主であった。われわれは筋組織への炎症誘導と侵害刺激による筋障害により長期間の痛み行動を示すモデル動物を開発したので報告する。

実験にはラットを用い, 腓腹筋にLPS (lipopolysaccharide) あるいは高張食塩水を単体投与した。また, LPSを高張食塩水に先行させた複合刺激群を作成した。測定は投与部位の圧痛閾値, 足底部のVFF (von Frey filament) テストを経時的に行ない, 下腿周径も計測した。複合刺激群では投与部位の圧痛と下腿の腫脹が回復した後もVFFへの反応が両側に亢進し数週間持続した。単体刺激群でも一過性の筋障害が発生したが痛み行動の程度と持続は低かった。これらのことより持続的な痛み行動を誘発するには炎症と侵害入力との両方が重要であることが示唆された。今回開発したモデル動物は筋障害性慢性痛症モデルとして有用であると思われる。

31. 筋障害性慢性痛症モデルラットにおける自律神経機能動態

○櫻井博紀¹, 橋本辰幸¹, 大道裕介¹, 張本浩平¹, 吉本隆彦¹, 江口国博^{1,2}, 山口佳子¹, 熊澤孝朗¹ (¹愛知医科大学医学部痛み学講座, ²愛知学院大学歯学部生理学講座)

慢性痛症発症の原因の一つとして深部組織障害が重要であると考えられている。現在, 我々は深部組織, 特に筋障害に起因した慢性痛症モデル動物の開発を試みている。慢性痛症病態時においては, 痛覚増強・アロディニアなど感覚障害に加えて, 浮腫, 皮膚温・発汗異常など自律神経機能の異常が出現することが多い。そこで, 今回作製した筋障害性慢性痛症モデルにおいて, 病態時における自律神経機能の経時的な変化を追跡することで, 痛み系と自律系と

の関連を検討していく。

自律系の動態として、麻酔下にて足底の皮膚血流・皮膚温、心拍および呼吸の変化を測定する。これらを指標として、胸郭圧迫、head-up tiltに加えて、種々の体性感覚刺激を行い、刺激に対する反応を解析することにより自律神経機能を検討した。

筋障害性慢性痛症モデルラットにおいて、処置後4wで正常ラットに比べてベース血流量、心拍数、患側皮膚温が低い傾向にあった。また、head-up tiltにより心拍数が減少する反応がより小さい角度でみられるなど、自律系のアンバランスな動態が示唆された。

32. 筋障害性慢性痛症モデルラットにおける心拍変動のスペクトル解析

○江口国博¹²、大道裕介¹、張本浩平¹、吉本隆彦¹、橋本辰幸¹、櫻井博紀¹、山口佳子¹、熊澤孝朗¹（¹愛知医科大学医学部痛み学講座、²愛知学院大学歯学部生理学講座）

筋障害性慢性痛症モデルラットでは病態発症に伴い自律神経活動水準にどのような変化が起こるのかを、種々の自律機能検査における心拍変動のスペクトル解析に基づき検索した。

各種筋障害性慢性痛症モデルラットを用い、病態発症前・後において、各種自律機能評価試験を行い、各試験刺激前後での心電図記録からR-R間隔を計測して得られる心拍数の継時的変動（心拍変動）を連続ウェーブレット変換し、0.02Hz間隔で0.1Hzから3.2Hzまでの各周波数成分のパワーの変動を継時的に計測した。スペクトル解析は呼吸周期に一致する高周波数帯（HF：1.8～2.5Hz）、Mayer waveの周期に相当する低周波数帯（LF：0.2～0.5Hz）および両者の中間周波数帯（IMF）での平均パワーを継時的に計測し、試験刺激前の各周波数成分の平均パワーおよび刺激により誘発される各周波数成分の変動の大きさを病態発症前・後で比較した。

試験刺激前での各周波数成分については、発症後、HFのパワーに有意な増加がみられた（ $p < 0.05$ ）。HF成分は副交感神経活動水準を反映すると言われていることから、筋障害性慢性痛症ラットでは病態発症に伴う副交感神経緊張の上昇が示唆された。

また試験刺激の種類に関わりなくほとんどの例で、試験刺激後に誘発される各周波数成分のパワーがいずれも病態発症後に増加する傾向があった。

33. 動きを手掛かりとした図形弁別におけるMT野の活動

○半田高史¹²、片井 聡¹、久野玲子¹、海野俊平¹、井上

雅仁¹、三上章允¹（¹京都大・霊長類研、²日本福祉大・情報）

空間情報と形態情報の統合過程を解明する目的で、空間情報の1つである動きを手がかりとして形態情報の1つである形を識別する課題をアカゲザルに訓練した。用いた視覚刺激は、静止ランダムドット背景上で、ある領域内のドットだけが一定方向に動くことによって輪郭が知覚されるShape From Motion（SFM）と呼ばれるものである。課題は遅延見本合わせ課題で、サンプル期に白い無地の図形を呈示し、遅延期間を経てターゲット期にSFM条件で2つの図形を呈示する。サルはターゲット期にサンプルと同じ図形を弁別し、つぎの反応期に図形を選択する。

先行研究ではSFM条件の図形弁別課題遂行中の前部上側頭溝（STSa）のニューロン活動を記録し、手がかりによらず図形に選択的に応答するニューロンや図形に関係なく動きに応答するニューロンなどがあることを見つけた。本研究ではSTSaと解剖学的に双方向的に結合している動きの情報処理の中核であるMT野に注目しSFM条件下で図形によって応答が異なる細胞を見つけた。記録したMT野ニューロンのうち35%が図形選択的応答を示した。そのうち33%のMT野ニューロンでは、標的刺激が妨害刺激より強い応答を示した。この結果はSFM条件下でMT野は形の知覚に関与している可能性を示唆した。

34. 画像処理装置を用いたゼブラフィッシュの3次元行動解析

○布目知也¹、村本健一郎¹、松川 通²、加藤 聖²（¹金沢大院・自然科学・電子情報工学専攻、²金沢大院・医・脳医学専攻）

魚類の中脳神経は切断しても再生することが知られている。特に視神経の再生に関する形態学や分子については多くの報告がなされているが、視覚機能の回復の観点から視神経の再生を評価するためには、回復過程にある魚類の行動を観測する必要がある。そこで我々は、コンピュータと2台のCCDカメラを用いて魚類の行動を3次元的に観測し、解析するシステムを構築した。このシステムでは、水槽の上方と側方の2台のCCDカメラからの画像を、同時に毎秒30フレームのフレームレートで撮影することが可能であり、従来は難しかったゼブラフィッシュなどの素早い行動の解析にも応用できた。本研究では、このシステムを用いて視神経再生過程におけるゼブラフィッシュの視覚依存性行動の解析から、視神経再生の評価を行った。この結果、片側の視神経切断時の遊泳行動の左右差から、視神経が切断されてから再び視蓋に到達するまでに約30日を要することがわかった。また、複数匹の追尾行動の解析から、

精密化を経て視覚機能が回復するまでにさらに約50日、計80日を要することがわかった。この他にも、ゼブラフィッシュの稚魚の行動を解析し、視覚機能の発達に対する評価も行った。

35. 仮想空間移動および空間連想課題における脳波—筋電図間の相関性

梅野克身, 堀悦郎, 田淵英一, 小野武年, 西条寿夫 (富山医科薬科大学大学院・システム情動科学, CREST, JST)

本研究では、ヒトの空間認知に関わる探索行動中の脳波と筋電図間の相関性について検討した。健康人7名を対象に、都市仮想空間(半径50m)移動課題と空間連想課題をテストした。都市仮想空間移動課題では、街路に数字の標識をつけた10カ所の目的地をグリーンベルトで連結し、被験者がジョイスティックを操作してグリーンベルトに沿って目的地を順番に移動した。空間連想課題では同様の移動を連想し、目的地を通過したらボタンを押すよう指示した。都市仮想空間移動課題では、ジョイスティックの稼働から400—500msecの潜時で前頭部および頭頂部に陽性電位をみとめ、独立成分中に θ 波のピークおよび θ 波パワーの増加がみられた。また、脳波とジョイスティックの前進および方向転換に関係する筋から記録した筋電図と間に θ , α , および γ 帯域で有意にコヒーレンスが上昇した。同様の傾向は空間連想課題でもみられたが、 θ および γ 両帯域脳波と筋電図間のコヒーレンスは、 α 帯域脳波(10Hzにピーク)と筋電図間のコヒーレンスと相反的關係にあることが判明した。以上のデータから、行動発現のメカニズムについて考察する。

36. Taste neuronal activities in the rat hippocampal formation

S.A. Ho^{1,2}, E. Tabuchi^{1,2}, K. Umeno^{1,2}, E. Hori^{1,2}, T. Ono^{1,2}, O.H. Nishijo^{1,2} (System Emotional Neuroscience, Toyama Med. & Pharmaceu. Univ., Toyama & ²CREST, JST, Tokyo)

To test whether the hippocampal formation (HF) neurons would respond to taste stimuli, multiple neural activities were recorded from the CA1 subfield of the HF in freely behaving rats. The rat could acquire one of sapid solutions in an open field: NaCl, sucrose, citric acid, quinine HCl (QHCl), monosodium L-glutamate (MSG), M guanosine 5' monophosphate (GMP), mixture of MSG and GMP, and distilled water. Of 200 CA1 neurons recorded, 124 changed their activity during licking. Among

these licking-related neurons, 24 responded differentially to the sapid stimuli (taste neurons). On the basis of response magnitudes, taste neurons were classified; 1 NaCl-best, 2 sucrose-best, 2 citric acid-best, 7 QHCl-best, 6 MSG-best, and 6 miscellaneous types. These results demonstrated that the HF encoded not only spatial but also gustatory information.

37. 宇宙生理学実験の一例—ラット圧受容器反射機構等の発達に対する微小重力の影響

清水 強¹, 山崎将生², 永山忠徳⁶, 和気秀文⁴, 勝田新一郎², 大石浩隆⁵, 三宅将生², 片平清昭³ (諏訪マタニテイククリニック附属清水宇宙生理学研究所, ²福島県立医科大学医学部生理学第1講座, ³同学部附属実験動物研究施設, ⁴ブリストル大学生理学教室, ⁵北海道稚内保健所, ⁶社会保険二本松病院)

我々は地上模擬実験等から、動物が微小重力環境下で発達すると、地上での発達と比べて、圧受容器反射の入力系のひとつである大動脈神経の線維構成が変化して無髄線維数が減少し、圧反射感度も減弱するという仮説を導き、これを検証するため宇宙環境での実験を行った。NASAとNIH他により1993年公募された国際共同宇宙実験Neuro-lab計画の26課題のひとつとして、1998年4月17日から16日間、スペースシャトル・コロンビアに生後9日齢のラットを母親と共に搭載し、高度約300kmの地球周回軌道上で飼育した。帰還直後麻酔下で、動脈圧、大動脈神経活動等を記録しながら昇圧降圧試験を行った後灌流固定し、各種組織を組織学的、分子生物学的に調べた。一部は更に30日間地上で飼育し同じ検索を行った。また、大動脈の収縮力や伸展性も調べた。これらの結果から先の仮説の正しいことが証明された。この実験は10年余を要したが、現在も解析は続いており、新たな所見を得つつある。

P1. カロテノイド色素・リコピン連続投与による抗酸化作用の検討: 運動ニューロン変性 (Mnd) マウスの発育に伴う脳内酵素活性の変動と運動機能の改善効果

○芳本信子^{1,2}, 藤田公和², 猪飼弘子¹, 菅沼大行³, 稲熊隆博³, 鈴木梨江¹, 永田 豊², 宮地栄一² (名古屋文理短期大学, ²藤田保健衛生大学医学部生理, ³カゴメ総合研究所)

私達は、CNS組織内運動ニューロン変性と四肢麻痺が進行して10か月齢以内の早期に死亡する遺伝的変異(Mnd)マウスを飼育して、これにリコピンを連続経口摂取させた場合、障害の改善がみられるかどうかを調べた。Mndマウスの脳内では発育が進むにつれて、6か月齢頃よ

りエネルギー産生系に関するシトクロムc酸化酵素(CO)と細胞障害性の活性酸素基(O₂⁻)を中和・無毒化するスーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)活性は低下し、組織変性指標酵素のトランスグルタミナーゼ(TGase)活性は上昇した。この動物にリコピン添加食を連日投与すると、CO、SOD活性の低下は阻止され、TGase活性の上昇も抑制された。また、リコピン投与のMndマウスの体重減少傾向も緩和され、四肢麻痺の発現時期も遅くなり、寿命も延長した。このような実験成績より、摂取されたリコピンが脳組織に抗酸化的に作用して運動機能回復に有効に作用していることが推察された。

P2. マウス嗅球顆粒細胞層に対するリポポリサッカライド末梢投与の影響

森 啓至, 金子葉子, 中島 昭, 太田 明(藤田保健衛生大・医・生理I)

目的: 近年, 神経変性疾患や統合失調症において, 嗅覚障害がその初期症状の一つとして報告されている。また, 神経変性疾患の発病原因の一つとして, TNF α など炎症性サイトカインの異常産生による神経細胞死が考えられている。このような事象から, 神経変性疾患における嗅覚異常と嗅球での免疫応答の関連性について検討する為, リポポリサッカライド(LPS)をマウス腹腔内投与し, 嗅球でのTNF α の発現とその作用について検討した。

方法: LPSをC3H/HeNマウスの腹腔内に投与後, 嗅球を含む脳を摘出。抗GFAP抗体と抗TNF α 抗体を用いた二重染色を行い, TNF α 産生細胞と産生部位の同定を行った。さらに, 嗅球とその周辺部位を対象にTUNEL染色を行った。初めまして, プロフィール拝見しました。その中で, って言われた言葉が強く印象に残り, 思い切っメールしています。

結果と考察: 抗体を用いた染色結果から, 嗅球の顆粒細胞層においてGFAP陽性細胞とTNF α 陽性像の重なりが認められ, TNF α 陽性像はLPS投与6時間後をピークに増加した。また, LPS投与24時間後の顆粒細胞層において, TUNEL陽性像が認められた。これらの結果から, 嗅球の顆粒細胞層に存在するアストロサイトは, LPS投与後早期にTNF α 産生を促進することが明らかとなった。さらに, TNF α 産生亢進と細胞死に何らかの関連があるものと推察された。

P3. ノルエピネフリンによるマウス青斑核内炎症性サイトカインの発現制御

○金子葉子, 森 啓至, 中島 昭, 太田 明(藤田保健衛生大学・医学部・生理学I)

近年, 神経変性疾患の病変部位において活性化したミクログリアの存在が確認され, 炎症性サイトカインの発現増加と神経変性疾患との関連が指摘されている。したがって, 中枢神経系における炎症性サイトカインの発現は厳密に制御されなければならない。

我々はこれまでに本学会で, リポポリサッカライド(LPS)投与によりマウスに炎症を起こすと, 青斑核においてノルエピネフリン(NE)の代謝回転が亢進することを報告した。今回我々は, NE代謝回転の亢進が, 青斑核における炎症性サイトカインの発現の制御に関与している可能性を示す。

LPS感受性マウスにLPSを腹腔内投与し, 青斑核における炎症性サイトカインの発現を解析した結果, TNF- α , IL-1 β mRNAの発現量の増加が認められた。この経時変化はNEの変化と一致していた。次に, 初代培養ミクログリアを用いてLPSとNE添加後の炎症性サイトカインの発現を解析した。LPSにより発現量が増加したTNF- α は, NEの添加によってmRNA, タンパク質共に発現量が減少し, 一方, IL-1 β は, NE添加によりmRNA, タンパク質共に発現量が増加した。以上の結果から, 中枢神経系における炎症性サイトカインの発現制御に, NEが関与していると考えられる。

P4. 金魚視神経再生過程におけるGAP-43の遺伝子発現

○永島幹子¹, 馬渡一浩¹, 郡山恵樹², 加藤 聖²(¹金沢大院・医・保健学専攻, ²金沢大院・医・脳医科学専攻)

哺乳類の視神経は損傷を受けると回復しないが, 魚類の視神経は再生する。切断された視神経はおよそ30日で再び視蓋に到達し, シナプス再編成の後, 視覚が回復する。この視神経の再生過程には様々な分子が関与しているが, 新しい神経回路網がどのように形成されていくかについては不明である。そこで私たちは成長関連遺伝子の1つであり, 軸索の先端部にある成長円錐に多く発現していることが知られているgrowth associated protein-43(GAP-43)に注目した。今回, 金魚視神経再生過程におけるGAP-43の役割について検討する目的で, GAP-43 mRNAの発現量の変化と局在について検討した。既知の金魚GAP-43 cDNAよりプローブを作成しノーザン法を行ったところ, 網膜におけるGAP-43 mRNAの発現量は視神経切断後急激に増加しおよそ10日で10倍とピークに達し, 30日には6倍まで減少しその後100日までは発現量が維持され, 100日を越えると再び減少し始め180日ではほぼ正常の値に復した。このGAP-43上昇の経過は視覚機能の回復とよく一致していた。また, GAP-43 mRNAおよびタンパクの発現は

神経節細胞に局在していた。

P5. 欠伸てんかんにおける、GABA_B、GHB受容体の相互作用について

○角田真吾¹、田中聖之²、中島廣志¹、加藤 聖² (¹金沢大院・医・保健学専攻、²金沢大院・医・脳医学専攻)

欠伸てんかんとは、四肢伸展、一点凝視や、けいれんを伴わない発作を引き起こす小児疾患である。脳波では、3Hzの勅徐波という特異的な発作波が検出される。動物実験で、CREBやAP-1の転写因子のDNA結合活性が上昇することが報告されている。欠伸てんかん発作発現には、視床一皮質回路における、GABA_B受容体の関与が示唆されているが、その詳細なメカニズムについては不明である。我々は、GABA_B受容体のみならず、GHB受容体に着目し、薬理学的手法を用いて、GHB受容体の欠伸てんかんへの関与について調べた。具体的には、マウスに、GABA_B、GHB両受容体のアゴニストであるγ-ブチロラクトン (GBL)、γ-アミノ酪酸 (GHB) や、GABA_B受容体のアゴニストであるBaclofen、そして、GABA_B受容体のアンタゴニストのCGP-52432、GHB受容体のアンタゴニストのNCS-382を使用し、脳波を測定した。その結果、NCSでGHB受容体を阻害することで、GBL、GHB誘発欠伸てんかんが抑制できた。このことから、GHB受容体も欠伸てんかんに関与していることが示唆され、両受容体の相互作用について精査した。

P6. 脳出血後のトレッドミル運動による運動機能の改善

○加藤尚子^{1,2}、増田 匡²、飛田秀樹²、石田和人^{1,2}、猪田邦雄¹、西野仁雄² (¹名大・院・医・理学療法学、²名市大・院・医・脳神経生理学)

本研究では線条体出血モデルラットを用い、出血後の運動機能と大脳皮質の萎縮に対する運動の効果調べた。コラゲナーゼ type IV (200U/ml, 1.4 μl) を線条体に注入し出血モデルラットを作製した。出血後4~14日まで毎日30分間トレッドミル運動 (9m/min) を行った。運動機能評価は、自発回転、角材歩行、前肢把握、後肢引き戻しの4項目とRota-rodを用いて出血6週間後まで行い、8週間後、脳組織学的検討を行った。

運動機能 (4項目の総合点) は、出血1週間後において運動群の方が有意に改善しており、特に前肢把握の改善がよく認められた。Rota-rodにおいても、運動群の方が有意に回復していた。ニッスル染色像では、脳実質の空洞化、脳質の拡大、大脳皮質の萎縮がみられ、残存する線条体に両群の差はなかった。大脳皮質運動野の萎縮は、前肢領域、

特にII/III層において、運動群の方が少ない傾向にあった。一方、後肢領域では差はみられなかった。これらの結果から、線条体出血後のトレッドミル運動は、前肢関連大脳皮質運動野 (II/III層) の萎縮を抑制し、運動機能改善と関連する可能性が示唆された。

P7. ドパミン神経細胞に対する pleiotrophin の神経保護作用

佐藤豊大、飛田秀樹、熊崎路子、櫻井輝美、西野仁雄 (名市大・院・医・脳神経生理)

ラット胎仔 (E15) 中脳由来の培養DAニューロンを用いて、pleiotrophin (PTN) の神経保護作用を調べた。ラットE15中脳腹側部組織を酵素処理し単離した後、 $25 \times 10^4/cm^2$ の細胞濃度でDAニューロンの培養を行った。培養5日目に6水酸化ドパミン (6-OHDA) を処置し、12時間後に固定、tyrosine hydroxylase (TH) 酵素免疫染色を行った。6-OHDA (0-40 μM) の細胞毒性は、濃度依存的であり、20 μM の処置ではTH陽性細胞の数は無処置 (対照) 群の $52.3 \pm 2.4\%$ であった。6-OHDA 処置の1.5時間前にPTN (100ng/ml) およびGDNF (100ng/ml) を前処置すると、TH陽性細胞はPTN前処置群では対照群の $64.5 \pm 1.9\%$ 、GDNF前処置群では $77.4 \pm 6.3\%$ に保たれた。PTN濃度 (0-300ng/ml) を変化させたところ、100ng/mlで最大効果が得られた。以上の結果から、PTNは6-OHDAによるDAニューロン神経細胞死に対する神経保護作用を有し、最大効果濃度は100ng/mlであることが明らかになった。

P8. ES細胞から神経細胞への分化誘導過程における低酸素の影響

成田朋子、飛田秀樹、金 泰善、西野仁雄 (名市大・院・医・脳神経生理学)

胚性幹 (ES) 細胞からドパミン (DA) ニューロンへの分化は、ES細胞の増殖、Embryoid Bodies (EBs) の形成、ネスチン陽性細胞の選別、ネスチン陽性細胞の増殖、DAニューロンへの分化、の5段階の過程を経て可能である。本研究は、ES細胞から神経細胞への分化誘導が、母体内の生理的酸素濃度 (低酸素) 条件下で如何に影響を受けるかどうかについて検討を行った。EBs形成時から低酸素下 (3.5%酸素, 37℃) で培養を行った場合には、20%酸素下で培養した場合と比べ、比較的均一な大きさのEBsと数多くのEBs (2.67 ± 0.35 倍, $n = 3$) が観察された。全細胞蛋白量を測定したところ、低酸素群では $0.71 + 0.01$ 倍 ($n = 3$) であり、全細胞数は少ないことが示唆された。すなわち、低酸素下では小さいEBsが多数形成されること

が示された。このことは、BrdU 取込能の低下からも確認された。一方、ネスチン陽性細胞の増殖期から低酸素条件下で培養を行った場合にも、20%酸素条件群と比べ比較的

均一な neurosphere が形成されることが分かった。この結果から、低酸素条件下ではES細胞から神経細胞への分化に影響を及ぼす可能性が示された。