

## 第97回近畿生理学談話会

日 時：2004年11月6日（土）

場 所：京都大学医学部内 芝蘭会館 (<http://office.med.kyoto-u.ac.jp/siran/siran.html>)

当 番：京都大学医学研究科

2004年11月6日土曜日、京都大学医学部・医学研究科敷地内の芝蘭会館に100人の参加者を迎え、第97回近畿生理学談話会を開催いたしました。午前中は9:40より12:00前まで単一の会場において、午後からは13:30より18:00まで2会場で、合計36演題の口演発表が行われました。午後の発表開始直前にはミーティングと称するセッションを設け、評議員会での議論内容など生理学学会員にとって重要と思われる事項が、4名の担当評議員により参加者全員に周知されました。運営にあたっては、近畿生理学談話会の近年のトレンドを踏襲し、若手中心のカジュアルな方式をもって望みました。終始活発な質疑応答が続き、若手会員の積極性を促す、という本方式ならではの効果が今回もまた発揮されたように思われます。座長は、他大学の若手会員にも依頼し、引き受けていただきました。この場を借りて改めて御礼申し上げます。

(当番幹事 河野・大森・野間)

### 1. 成熟ラット脊髄切断後の急性期軸索反応と軸索再生 西尾健資（京都大学 医学研究科 認知行動脳科学）

[目的] 成熟哺乳動物における中枢神経軸索再生は困難である。その理由として、損傷部の瘢痕組織やミエリン関連蛋白が軸索再生を阻害すると考えられている。一方、我々は幼若ラット脊髄切断後24時間以内に損傷部を越えて軸索再生が誘導され、損傷部の瘢痕形成は軸索再生失敗の結果と考えられた。これには超早期の軸索再伸長(sprouting)が必要条件となるが、同様の現象が成熟ラットでも起こっているかどうかは不明である。そこで以下の実験を行った。[方法] 成熟ラットの下部胸髄を鋭利な剃刀で部分切断後、早期の軸索変化を免疫組織学的に検討した。[結果] 白質切断直後より切断周囲の軸索は、beta-tubulin 低下、neurofilament/peripherin 亢進という特徴的な軸索反応を示した。また、4時間後には二次的軸索切断と同時にbeta-tubulin陽性の発芽現象も認められた。この発芽現象は切断末梢端からも認められた。順行トレーサーを含む再生軸索は、切断部に残る変性軸索によって伸長が阻害されていた。[考察] 切断早期の切断部周囲の軸索変化は、Povlishockらのfocal axonal injuryと一致していた。また、観察所見は軸索内での局所蛋白合成を示唆した。[結論] 成熟ラットにおいても切断後非常に早期からsproutingに続いて軸索再生が起こっているが、損傷部局所の変性軸索がこの伸長を阻害すると考えられた。

### 2. マウス蝸牛神経核のGolgi cellにおけるムスカリンによる興奮性の修飾

入江智彦, 福井 巖, 大森治紀（京都大院 医 生理）  
ホ乳類の背側蝸牛神経核では、principal neuronは聴神経からの入力と、体性感覚を中心とした情報の入力を受ける。後者の入力はgranule cellの軸索であるparallel fiberにより伝えられる。背側蝸牛神経核は小脳とニューロン構成が類似しており、granule cellは小脳と同様に抑制性のGolgi cellと相互にシナプスを形成する。小脳ではGolgi cellの存在が協調性運動に大きな役割を果たしており、蝸牛神経核のGolgi cellもparallel fiberの活動調節に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、Golgi cellは数が少ないこともあり、電気生理学的研究は殆どなされていない。そこで、Golgi cellが代謝調節型グルタミン酸受容体2 (mGluR2) を発現することに着目し、mGluR2のプロモーターでGFPを発現する遺伝子改変マウスを用いて実験した。二重免疫染色法でGFP陽性GABA陽性のGolgi cellと考えられるニューロンを同定し、マッピングしたところ、アセチルコリンエステラーゼ陽性の領域との重複を認めたので、アセチルコリンによって興奮性が調節されると推測した。これを確かめるために、パッチクランプ法でGolgi cellのアセチルコリンに対する反応を調べた。その結果、Golgi cellはムスカリン性受容体を介して抑制されることが分かった。ムスカリンで誘導される電流の電流-電圧曲線は、内向き整流性を持ち、反転電位は $E_K$ と近い値を示した。この結果より、この抑制にはGIRKチャ

ネルが関与している可能性が示唆される。

### 3. 処理周波数に依存する神経回路機構

福井 巖<sup>12</sup>, 大森治紀<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>京大・医・先端領域融合医学研究機構, <sup>2</sup>京大・医・神経生物)

音は蝸牛器官の構造的特徴により周波数ごとに分解され、特定の周波数の音情報が聴神経によって脳幹に伝達される。このとき聴神経は音の位相に応じて発火し、鳥類の場合、大細胞核と角状核に投射する。大細胞核はさらに両側の層状核に投射し、ここで左右の音の位相差が計算され、各周波数の位相差情報から音源定位が行われている。正確な音源定位を行うために大細胞核の果たすべき役割は各周波数の位相情報を精度よく層状核に伝える事である。処理周波数による大細胞核の伝達機構の違いを調べた。

大細胞核の細胞の時定数は低周波数領域 (L, Low) で長く、高周波数領域 (H, High) で短かった。投射する聴神経の終末はLではブトン様で小さく、Hでは大きな球状で細胞を囲んでいた。聴神経を刺激するとHでは1つの入力で非常に大きなシナプス後電流が流れ、発火に十分であるのに対して、Lでは複数の入力が発火に必要であった。また *in vivo* の記録では、Lでのみ位相情報の精度の向上が見られた。

Hにおける大きなシナプスは伝達時間の変動を少なくし、短い膜時定数は高頻度の応答を可能にしていると考えられる。一方Lで見られた位相情報の精度の向上は、複数のシナプスからの入力の統合によるものであると考えている。

### 4. ラット前庭の器官培養による有毛細胞の再生

田浦晶子<sup>1</sup>, 大森治紀<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>京都大・医・耳鼻咽喉科学, <sup>2</sup>京都大・医・神経生物学)

ほ乳類内耳では障害後の機能的再生は知られていない。前回我々はラット前庭器官培養標本を用いて、有毛細胞感覚毛への障害および自発的再生と再生後の機能回復を報告した。今回、微分干渉顕微鏡および走査電子顕微鏡による形態的所見を加えて報告する。P2ラット前庭器官を培養し、ゲンタマイシン (GM) で有毛細胞を障害し、その後の再生過程を検討した。有毛細胞は機械刺激を電気信号に変換する機械電気変換 (MET) 機能を持つ。我々は有毛細胞をCa感受性色素 fura-2/AM型で染色し、METをCa信号として評価した。水流刺激を感覚毛に与えて生ずるCa信号は、GM およびL型Caチャンネル阻害剤 nifedipine で消失するので、METにより生じた膜脱分極で活性化する側壁膜Caチャンネルの活性化により上昇する細胞内Caを検出していると考えた。またGMの投与により、感覚毛は

かなり消失しMETも失われたが、培養の継続により2週目以降MET機能が現れ、SEMによる観察では短い感覚毛様構造が出現した。さらに、ステロイドの持続投与によりMET機能を有する培養標本の割合が増加した。以上より、ほ乳類前庭器では、障害後2週間でも有毛細胞が再生し、ステロイドがMET機能再生に有効である事が明らかになった。

### 5. 治療的電気けいれん刺激 (ECS) は Homer1a 発現を介して新皮質錐体細胞を過分極させる

阪上-上岡 優<sup>12</sup>, 山本兼司<sup>23</sup>, 杉浦重樹<sup>4</sup>, 井ノ口 馨<sup>5</sup>, 林 拓二<sup>1</sup>, 加藤伸郎<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>京大精神医学, <sup>2</sup>京大認知, <sup>3</sup>京大神内, <sup>4</sup>奈良医大, <sup>5</sup>三菱化学)

Homer/Ves1はmGluR, IP<sub>3</sub>R, TrpCなどと結合する Scaffold proteinである。このうち、活動依存的に発現する最初期遺伝子産物であるHomer1aタンパクを、パッチクランプ法を用いてラット視覚野錐体細胞内へ注入した。数分の経過で神経細胞の興奮性が低下し、これには「group I mGluRの活性化 → PLC βの活性化 → IP<sub>3</sub>産生の増大 → IP<sub>3</sub>Rを介する細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出 → BKチャンネルの開口傾向の増大」を必要とした。ラットに electroconvulsive shock (ECS) を与えると、Homer 1aが急激に発現されると期待できる。ECS施行後にスライスを作成したところ、1~4時間以内では、Homer 1a注入と同等の興奮性低下を認めた。これは抗Homer 1a抗体で阻止され、さらにHomer 1aによる興奮性低下と同様の細胞内シグナルを必要とした。

ECSにより、Homer 1a発現を介して錐体細胞の興奮性が低下すると示唆される。これがECSの臨床効果と関わる可能性もある。

### 6. 線条体における動機づけと報酬予測誤差の表現

山田 洋, 井ノ川 仁, 木村 實 (京都府立医科大学大学院医学研究科神経生理学)

大脳基底核線条体は、中脳ドーパミン細胞によってもたらされる動機づけや報酬予測誤差信号に基づいて意志決定や行動計画過程に関与することが示唆されているがメカニズムは明らかでない。我々はこれを調べるために、3つの選択肢から一つの正解を試行錯誤で探す意志決定課題を1頭のサルに行わせ、線条体から持続放電型の細胞 (TANs) を記録した。行動課題中に、サルは1度目の選択で33%、2度目で50%、3度目で約100%の確率で報酬を獲得する。サルが手元の保持ボタンを押し、その後点灯する3つのボタンから一つを選ぶと正解・不正解を知らせるピーブ音が鳴る。行動を開始するための保持ボタンの点灯に対する

TANsの応答は報酬確率には依存せず、何度目の選択であっても同様に応答が観察された。一方、正解・不正解を知らせるピープ音に対する応答は報酬確率の低い選択で良く観察され、正解がわかった後の繰り返しの選択では応答が観察されなかった。この結果は、線条体のTANsが動機づけや報酬予測誤差情報によって意志決定や行動計画過程に関わることを示唆しており、その過程はドーパミン依存的と考えられる。

## 7. 視床線条体系における運動計画の切り替え機能

堀 由紀子, 南本敬史, 木村 實 (京都府立医科大学大学院 神経生理)

報酬の得られる行動は素早く確実に実行されるが、将来の報酬に向けて当面は無報酬である行動選択も必要になる。私たちは、サルを用いたGO-NOGO課題でGO, NOGOの報酬量に大, 小の差を設けた。大報酬のGO反応は小報酬のGO反応よりも反応時間が短かった。視床の尾側髄板内核であるCM核の細胞は、GO, NOGOの行動の種類に関わらず小報酬試行で特異的に活動したので、大報酬の行動の指示の待機から小報酬の行動の指示による行動の切り替えに関わることが示唆された。そこで、行動の切り替えにはCM細胞の活動が線条体や大脳皮質に投射され、GO, NOGO依存的な行動計画に用いられるという仮説を立て、検証実験を行った。サル線条体の58個の細胞の活動を記録した。GO, NOGO(報酬の大小)の指示後に現れる活動は、GOで活動し小報酬行動選択的(GOタイプ, 6)またはNOGOで活動し小報酬行動選択的(NOGOタイプ, 8)な細胞が多かった。GOでは報酬依存性がないがNOGOでのみ小報酬行動選択的な細胞(8)もあった。GO, NOGO指示前の活動(5), 報酬に非依存的な行動関連活動(8), 報酬関連活動(7), その他(13)なども見られた。これらの結果は視床線条体系が運動計画の切り替えに関わるという仮説を支持する。

## 8. ラットの自発性運動における準備電位と運動の開始

関 智美, 玄番央恵, 松崎竜一, 中尾和子 (関西医科大学・生理学第二講座)

ラットを訓練して自己ペースによる右前肢運動(自発性前肢運動)を行わせて、左大脳皮質(運動皮質, 体性感覚皮質及び後頭皮質)に埋め込んだ慢性電極によって電場電位を記録した。大脳皮質の表面が陰性一深部が陽性(s-N, d-P)の電位が、運動開始の約1.0秒前(0.5-1.5秒)に、前肢の運動野(RFAとCFA)および体性感覚野に出現した。一方、後頭皮質には出現しなかった。さらに、これらの慢性電極を用いて電気刺激し、両側の顔面, 体幹, 前肢, 後

肢に刺入した双極針電極によって筋電活動を同時記録した。運動野を刺激すると前肢と顔面から筋電活動が記録された。一方、体性感覚野の刺激では概して前肢とその他数箇所の体部位から同時に筋電活動が記録されたが、刺激と同側体部位の筋電活動の誘発には、対側よりも高い刺激強度が必要であった。さらに前肢の筋電活動を誘発するための刺激強度は、CFAを刺激した場合が最小であった。筋電活動と電場電位の出現部位の比較検討から、s-N, d-P電位の出現部位を刺激すると、刺激と対側の前肢から筋電活動の誘発されることが明らかとなった。このことから、s-N, d-P電位は、ラットの四肢運動において、運動開始のための筋活動を活性化するための準備電位であることが示唆された。

## 9. 能動的頭部回転中の高速運動物体に対する動体視力と眼球運動の関係

中村治子<sup>1</sup>, 領内友佳里<sup>1</sup>, 平山幸人<sup>2</sup>, 山下勝幸<sup>3</sup>, 和田佳郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>奈良医大・医学部3年, <sup>2</sup>中部大学・工学部4年, <sup>3</sup>奈良医大・第一生理)

能動的頭部回転中の高速運動物体に対する動体視力と眼球運動の関係を解析した。実験は健康成人(4名)を対象に、モニター上を左から右に等速運動(60, 90, 120, 150 deg/s)しながら変化する3つの数字を、C)頭部を左から右(数字と同方向)に回転、D)頭部を右から左(数字と反対方向)に回転、という条件で読み取らせ(各10回)、同時に眼球運動(DC-EOG)と頭部運動(ポテンシオメータ)を測定した。数字(3番目)の正答数の平均は、いずれの速度においてもC, D条件で差はなく、両者とも高速になるほど低くなった。眼球運動に関しては、高速になるほど急速眼球運動の出現率はC>D, retinal slipはC<Dの傾向が認められた。以上の結果から、同方向の頭部運動はretinal slipを小さくするが、前庭動眼反射(VOR)の急速眼球運動によって視覚が抑制され、反対方向の頭部運動はretinal slipを大きくするが、VORによって高速な滑動性眼球運動が可能となる、という動体視力に対する効果が示された。

## 10. 頭部静止状態での高速運動物体に対する動体視力と眼球運動の関係

領内友佳里<sup>1</sup>, 中村治子<sup>1</sup>, 平山幸人<sup>2</sup>, 山下勝幸<sup>3</sup>, 和田佳郎<sup>3</sup> (<sup>1</sup>奈良医大・医学部3年, <sup>2</sup>中部大学・工学部4年, <sup>3</sup>奈良医大・第一生理)

頭部静止状態での高速運動物体に対する動体視力と眼球運動の関係を解析した。実験は健康成人(4名)を対象に、モニター上を左から右に等速運動(60, 90, 120, 150

deg/s) しながら変化する3つの数字を, A) 頭部も眼球も静止(コントロール), B) 頭部は静止し眼球で追跡, という条件で読み取らせ(各10回), 同時に眼球運動(DC-EOG)を測定した. 数字(3番目)の正答数の平均は, A条件では速度に関係なく一定であったが, B条件では高速になるほど低くなった. 個体差は高速(150 deg/s)になるほど大きくなり, B条件で正答数の高い被験者2名(平均6.5)は低い被験者2名(2.0)に比べて, A条件でも正答数が高く(7.0 vs 2.5), B条件でのsaccadeの出現率が高く, retinal error(7.8 vs 15.8 deg)やretinal slip(104 vs 145 deg/s)が小さい傾向が認められた. 以上の結果は, 高速運動物体に対する動体視力には, 周辺視野での動体視力とcatch-up saccadeが重要な要素であることを示している.

### 11. 三叉神経中脳路核ニューロンにおけるAMPA受容体の特性

○松原 聡<sup>12</sup>, 齊藤 充<sup>2</sup>, 姜 英男<sup>2</sup> (<sup>1</sup>大阪大学院・歯・顎口腔病因病態制御, <sup>2</sup>大阪大学院・歯・高次脳口腔機能)

【目的】閉口筋筋紡錘および歯根膜からの感覚を中継する三叉神経中脳路核(MTN)ニューロンは, 細胞体にグルタミン酸受容体を発現していることが知られている. 本研究では, MTNニューロンにおけるグルタミン酸受容体の電気生理学的特性を調べた. 【方法】7~14日齢のラットを用いてMTNを含む厚さ200 $\mu$ mのスライス標本を作製し, MTNニューロンにグルタミン酸をパフ投与し電圧固定下で電流応答を記録し, その解析を行った. 【結果】1秒以下の早い時間経過を示す内向き電流成分と数秒以上持続する内向き電流成分よりなる2相性の応答が観察された. 時間経過の早い成分は顕著な内向き整流特性を示した. 【考察】これまでAMPA受容体において, 外向き整流特性をもつI型はGluR2サブユニットを含む受容体構造をもち, 内向き整流特性をもつII型はGluR2サブユニットを含まない受容体構造であることが知られている. 一方, 免疫組織化学的手法によりMTNニューロンにGluR2が発現していることが既に報告されているが, 我々の研究により, 時間経過の早い成分が強い内向き整流特性を示したことから, MTNニューロンにおいてはGluR2が機能していない可能性が考えられた.

### 12. 大脳皮質の興奮性および抑制性ニューロンの樹状突起発達に対する神経活動抑制の効果

丸山篤史<sup>12</sup>, 小原圭吾<sup>12</sup>, 柳川右千夫<sup>3</sup>, 小幡邦彦<sup>4</sup>, 津本忠治<sup>12</sup> (<sup>1</sup>大阪大学医学系研究科, <sup>2</sup>SORST/科学技術振

興機構, <sup>3</sup>群馬大学医学研究科, <sup>4</sup>理化学研究所脳科学総合研究センター)

我々は, 大脳皮質ニューロンの樹状突起発達においてはシナプス前部から移行する脳由来神経栄養因子(BDNF)の作用が興奮性および抑制性ニューロンで異なることを報告した. BDNFは神経活動によって移行することも見出したので, 神経活動が興奮性および抑制性ニューロンの発達に異なる作用を及ぼすことが推定される. この可能性を調べるため, 緑色蛍光蛋白質を指標として抑制性ニューロンを同定できるGAD67-GFP knock in miceの大脳皮質ニューロン分散培養標本を用いて, 神経活動を抑える薬剤の作用を形態学的に解析した. 播種後7日目で, 抑制性ニューロンに関しては, Tetrodotoxin投与群とN-methyl-D-aspartate(NMDA)型グルタミン酸受容体拮抗薬投与群, 及び非NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬投与群で対照群より樹状突起の発達が有意に悪かった. 興奮性ニューロンに関しては, そのような変化は見られなかった. 以上, 播種後7日目では, 神経活動抑制の効果は抑制性ニューロンで顕著に現れ, 興奮性ニューロンでは, それほど見られないことが判明した.

### 13. 麻酔下ニワトリを用いた音圧差計算神経回路

佐藤達雄, 福井 巖, 大森治紀(京大・神経生物)

音源定位には音情報の両耳時間差(ITD), 両耳音圧差(ILD)が重要である. 鳥類では音情報は周波数毎に時間経路と音圧経路が平行処理され, 上位核で両耳音比較される. ITD計算過程は様々な鳥類のin vivo実験・ニワトリのin vitro実験で多く示されたが, ILD計算過程はメンフクロウのin vivo実験(外側毛様帯後腹側核VLVp)にて示されたのみである.

細胞生理学レベルでILD計算過程を解析するため, ニワトリVLVpにパッチクランプ法を検討している. しかし同じ鳥類でもニワトリとメンフクロウにおいて同一計算過程を持つとは限らずニワトリin vivo脳内でのILD計算様式を示す必要がある.

まずニワトリの固定脳幹を用いて時間情報・音圧情報の解剖学的経路を蛍光色素で確認した. 次にタングステン電極にてin vivoのVLVpより細胞外電気記録後, 蛍光色素を電氣的穿孔で導入し記録核に投射する入力核を調べた. 最後に微小電極にて細胞外電気記録を行ない, ILDをコードする細胞を記録した.

この結果, 入力線維様式の違いなどにも関わらず, メンフクロウと同様にニワトリでもVLVpがILD計算核である可能性が示された. 今後, 細胞外記録した細胞を蛍光ラベルする手法を洗練すれば, 投射線維の属性がスライスに

て明らかとなり有用である。

#### 14. 脈絡膜上—経網膜刺激法を用いた人工視覚の空間分解能評価

神田寛行<sup>1,2,4</sup>, 三好智満<sup>1</sup>, 森本 壮<sup>1,2,3</sup>, 不二門 尚<sup>2,3</sup>, 田野保雄<sup>3</sup>, 澤井 元<sup>1</sup>, 福田 淳<sup>1</sup> (大阪大学大学院医学系研究科情報生理学,<sup>2</sup>感覚機能形成学,<sup>3</sup>眼科学,<sup>4</sup>(株)ニデック人工視覚研究所)

我々は人工網膜用の網膜刺激方法として「脈絡膜上—経網膜刺激法 (Suprachoroidal-Transretinal Stimulation ; STS)」を考案した (神田, 第80回生理学会大会発表)。今回, STSの空間分解能を評価する目的で, 麻酔非動化したネコにおいてSTSによる網膜上での興奮の範囲を電気生理学的に調べた。眼球後局部の強膜開窓部に設置した白金製刺激電極 (直径0.1 mm) と硝子体内に刺入した針型刺激電極を通じて, 単発のSTS (二双性矩形波, パルス幅0.5 ms/phase) を網膜に与えた。そのSTSに対するスパイク応答を同側の外側膝状体背側核の単一中継細胞より細胞外記録し, その閾値を調べた。眼前のスクリーン上に投影させた網膜刺激位置と, 記録した中継細胞の受容野中心との距離を12度から3度まで下げていくと閾値は500  $\mu$ A から150  $\mu$ A へ下がっていった。これらの結果から, 刺激電流を弱めると刺激電極付近の興奮の範囲が少なくとも3度以内に限局することが示唆された。

#### 15. 経角膜電気刺激の損傷網膜神経節細胞に対する神経保護効果

森本 壮<sup>1,2,3</sup>, 三好智満<sup>1</sup>, 松田 理<sup>3</sup>, 不二門 尚<sup>2,3</sup>, 田野保雄<sup>3</sup>, 福田 淳<sup>1</sup> (大阪大学大学院医学系研究科<sup>1</sup>情報生理学,<sup>2</sup>感覚機能形成学,<sup>3</sup>眼科学)

目的: 視神経切断後に視神経に電気刺激を行うことによって, 網膜神経節細胞 (RGC) の生存が促進することを, これまでに報告した。今回, より侵襲の少ない方法である, 経角膜電気刺激法についても, RGCに対する神経保護効果とそのメカニズムについて検討した。方法: RGCを標識したラットの片眼の視神経を切断し, 経角膜電気刺激 (100  $\mu$ A, 20Hz) を1時間行い, 1週間後に生存しているRGCの密度を求め, 電気刺激の効果について検討した。次に, 4つの主要な神経栄養因子 (BDNF, CNTF, bFGF, IGF-1) とその受容体 (TrkB, CNTF-R, FGFR-1, IGF-1R) のmRNAの経角膜電気刺激後の網膜内発現の変化について, RT-PCRを用いて検討した。さらに免疫組織染色でその局在について検討した。結果: 視神経切断1週間後では, 元の密度の54%にまでRGCが減少するのに対し, 電気刺激を行うと84%のRGCが生存していた。また,

RT-PCRの結果, IGF-1のmRNAのみが, 電気刺激1日後から7日後まで上昇した。さらに, IGF-1はMüller細胞で強く発現していた。結論: 今回の検討により, 経角膜電気刺激にRGCに対する神経保護効果があり, その神経保護のメカニズムは, 電気刺激によってMüller細胞からのIGF-1の放出が関与していることがわかった。

#### 16. ネコ一次視覚野のニューロン活動と視覚マスキング

石川理子, 木田裕之, 七五三木 聡, 佐藤宏道 (大阪大学健康体育部・生命機能研究科・基礎工学研究科)

視野の一部に短時間呈示した刺激 (ターゲット) の知覚が, それに0-100ミリ秒の遅れで周囲に短時間呈示した刺激 (マスク) によって妨害される現象をメタコントラストという。我々はヒトを用いた心理実験により, メタコントラストのメカニズムとして異なる時間特性及び刺激特徴選択性を示す2種類の視覚情報処理経路の相互作用が示唆された。この可能性について検討するために麻酔非動化したネコの一次視覚野 (V1) ニューロンの活動を記録し, 様々の時間間隔及び刺激特徴 (方位・空間周波数) で, 受容野にターゲット及び受容野周囲にマスクを呈示したときの応答の変化を観察した。刺激にはサイン波状に輝度変化する静止グレーティングを用い, ターゲットは500ミリ秒, マスクは50ミリ秒の呈示とし, マスク呈示のタイミングはターゲットのオンセットに対して-120ミリ秒から+120ミリ秒の遅れとした。その結果, マスクによるターゲット応答の修飾は反応の時間経過に応じて促進性および抑制性の変化を示した。また修飾効果の刺激特徴依存性は, マスク呈示のタイミングに依存して変化した。これらの観察は, V1レベルでの時空間特性の異なる情報処理経路間の相互作用がマスキングに関与していることを示唆する。

#### 17. 刺激サイズに依存したV1ニューロンの方位選択性の変化

岡本正博, 内藤智之, 定金 理, 佐藤宏道 (大阪大学健康体育部・基礎工学部)

一次視覚野 (V1) ニューロンの受容野刺激に対する応答は受容野周囲に呈示した刺激によって抑制性修飾を受ける。また過去に, 受容野周囲刺激によって抑制を受けるV1ニューロンでは, 受容野よりも大きな刺激を用いると, 受容野サイズで計測した反応に比べて方位チューニングがよりシャープになることが報告されている (Kato & Bishop 1974)。我々は, この現象のメカニズムを麻酔非動化したネコのV1で検討した。刺激にはサイン波状グレーティングを用い, 最適な空間周波数・速度・コントラストを持

ち、ニューロンの受容野サイズよりも大きな刺激に対する反応の方位チューニングの半値幅と、受容野刺激に対する反応のそれを比較した。27個のニューロンについて解析した結果、受容野よりも大きな刺激を用いたときの応答は抑制性修飾の強弱にかかわらず方位チューニングの半値幅が変化しないものから60%程度まで狭まるものまで観察されたが、43% (12個) のニューロンにおいて半値幅が80%以下になった。この結果は受容野外刺激による反応抑制に伴う単純なiceberg効果では説明できず、受容野より大きな刺激に対する応答では最適方位に対する応答を温存し、それ以外の方位に対する応答を抑制するメカニズムがあることを示唆する。

### 18. 蝸牛内直流電位の発生に対するCa<sup>2+</sup>の役割

二村吉継<sup>1,2</sup>, 森 禎章<sup>1</sup>, 峰晴昭仁<sup>2</sup>, 高巻京子<sup>2</sup>, 荒木倫利<sup>2</sup>, 竹中 洋<sup>2</sup>, 窪田隆裕<sup>1</sup> (<sup>1</sup>大阪医科大学第二生理, <sup>2</sup>同耳鼻咽喉科)

目的: 蝸牛内リンパ腔は+80mV程度の蝸牛内直流電位(EP)を有しているが、そのCa<sup>2+</sup>濃度([Ca]<sub>i</sub>)は10<sup>-6</sup>M程度ときわめて低く、無呼吸負荷時にはEPの低下と[Ca]<sub>i</sub>の上昇が観察される。本研究ではCa<sup>2+</sup>キレート剤を用いて、EPの発生に対するCa<sup>2+</sup>の役割を検討した。

方法: EP測定用電極およびCa<sup>2+</sup>測定用電極は、モルモット蝸牛第2回転より経血管管的に内リンパ腔に刺入した。また、薬剤は灌流用ピペットを用いて、内リンパ腔または外リンパ腔に灌流した。

結果: コントロール条件および無呼吸負荷時にはEPと[Ca]<sub>i</sub>の対数値との間に相関が認められたが、EGTA溶液の内リンパ腔灌流により人工的に[Ca]<sub>i</sub>を低下させてもEPは殆ど変化しなかった。しかし、EGTA/AMを含んだEGTA溶液を灌流すると、EPは軽度上昇するとともに、無呼吸負荷によるEPの低下が抑制された。また、EGTA/AM溶液を外リンパ腔に灌流しても、EPの上昇は認められなかった。

結論: EPの発生には、内リンパ腔に直接面した細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が重要な役割を担っているものと思われる。

### 19. 細胞内外のカルシウムが皮質錐体細胞の10Hz集合的膜電位振動及び発火に与える影響

山本 亮, 後藤史子, 加藤伸郎 (京都大学医学研究科認知行動脳科学)

ラット視覚野スライス標本からフィールド電位記録とパッチクランプ記録を用いて、II/III層の錐体細胞における10Hz前後の集合的電気活動(膜電位振動及び発火)を調

べた。この周期的な活動はスライスにおいては、1) 低マグネシウム、2) GABA受容体ブロック、の各条件でそれぞれ起こる。1)の条件で起こる活動はNMDA受容体をブロックすることで消失し、2)の条件で起こる活動はNi<sup>2+</sup>を投与することで消失する。また、この二種類の条件下で起こる周期的活動は共にIP3受容体をブロックすることによりその周期性を失った。このことから、細胞内のカルシウム上昇をきっかけとした、IP3受容体からのカルシウム放出(CICR)が、皮質における10Hzの集合的電気活動(膜電位振動及び発火)に大きな影響を与えていると推察される。

### 20. HCNチャンネルにおける第一膜貫通領域の構造と機能との関係

石井孝広, 大森治紀 (京都大学医学部生理学教室)

過分極で活性化される陽イオンチャンネル(HCNチャンネル)には4種類のサブタイプが存在し、サブタイプによって過分極による活性化速度やcAMPに対する感受性に違いがあり、その違いが役割の違いに寄与していると考えられている。しかし、機能と構造との関係は解明されていない部分が多い。

以前に、活性化速度の違いが第一膜貫通領域(S1)の後半部分の違いに関係していることを報告したが、今回はS1に点変異を導入し、変異体を哺乳類細胞発現系とホールセルパッチクランプ法を用いて電流を測定し解析した。S1部分に大きな疎水性の側鎖を持つトリプトファン残基を導入し、チャンネル機能が保たれるかを解析したところ、15個の変異体のうち7個の変異体からは大きな電流が測定された。その周期性からS1はアルファヘリックスをとることが示唆された。また、トリプトファン残基を導入して活性化速度が変化する部位はサブタイプ間で活性化速度の違いを引き起こす部位に相当した。電流が認められないもしくは少しの電流しか示さなかった変異体のほとんどはHCNチャンネルのサブタイプ間で保存されているアミノ酸残基に変異を導入したものであった。このことは保存されているアミノ酸残基が並ぶ面が他の膜貫通領域に面していることを示唆していると考えられる。

### 21. 層状核における同時検出精度の特徴周波数依存性

久場博司, 山田 玲, 大森治紀 (京都大学医学部生理学教室)

音源の位置を正確に知ることは動物が生存していく上で重要である。この音源定位の精度は音の周波数に依存し、鳥類では可聴周波数帯域の中間域で高いことが知られている。両耳に到達する音の時間差(ITD)は音源定位の手が

かりである。これは層状核 (NL) 神経細胞が両耳からのシナプス入力の時同時検出器として働くことにより検出される。また、NL では細胞が特徴周波数 (CF) 毎に配列され、ITD は各 CF 毎に検出される。今回、我々はニワトリ脳幹スライス標本を用いて、NL 細胞の形態、電気生理学的性質、及び同時検出精度を CF 毎に調べ、音源定位の周波数依存性に関わる要因を検討した。NL では CF の増加に伴って樹状突起の長さが増加し、さらに膜容量、過分極で活性化される陽イオンチャネル電流、EPSC の時間経過も増加した。一方、NL 細胞の膜抵抗は middle CF 域で低く、このため膜の時定数、及び EPSP の時間経過は middle CF 域で最も短縮された。これは middle CF 域の細胞が dendrotoxin 感受性の電位依存性  $K^+$  チャネル、特に  $Kv1.2$  を最も多く発現することによる。この結果、同時検出精度は middle CF 域で最も高く、このことが中間周波数帯域における高い ITD 検出精度の実現に関わっていると考えられる。

## 22. 麻酔下ニワトリ層状核における両耳間時差の検出

西野恵里, 久場博司, 船曳和雄, 大森治紀 (京都大学医学研究科神経生物学)

水平面における音源定位の手がかりの一つに、両側の耳に音が到達する時間差 (両耳間時差: ITD) がある。鳥類では、大細胞核 (NM) で音の時間情報が抽出され、層状核 (NL) に投射される。NM から左右の NL への投射線維が遅延線形成し、個々の NL 細胞が NM からの興奮性入力の時同時検出器として働くことにより、ITD は NL 内の位置として符号化されると考えられている。

ニワトリ NL における *in vivo* での ITD 感受性に関しては、これまでに報告がない。そこで、麻酔下のニワトリ (P3~7) の NL から、ガラス管に挿入したタングステン電極を使用して、細胞外電位を記録した。ガラス管から蛍光色素を注入することによって、記録部位をラベルした。刺激として、イヤホンを通して純音または白色雑音を提示し、ITD を変化させた。

NL で記録された細胞外フィールド電位は、刺激に対して強い共鳴を示した (ニューロフォニック電位: NP)。NP の振幅から特徴周波数 (CF) を決定したところ、NL 内には特徴周波数局在性が見られた。NP の振幅は ITD に応じて周期的な変化を示し、その周期は CF と一致していた。また、CNQX で特異的に阻害されるなどの性質から、NP は NL の EPSC であることが示唆された。

## 23. G-CSF は cIAP の発現を誘導することにより好中球の生存を延長する

羽藤文彦, 長谷川太郎, 鈴木賢一, 阪本親彦, 太田健介, 西木さおり, 日野雅之, 巽典之, 北川誠一 (大阪市立大学大学院医学研究科細胞情報学, 血液病態診断学)

好中球は自発的なアポトーシスにより短期間で死滅していく。顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) は好中球の生存を延長するが、その機序については十分に解明されていない。今回、ヒト好中球における inhibitor of apoptosis (IAP) protein の発現を調べ、サイトカインによる好中球生存の延長との関連について検討した。

ヒト好中球は cellular IAP (cIAP) 1, cIAP2, X-linked IAP (XIAP) を発現することが RT-PCR 法にて確認された。cIAP の発現は G-CSF 刺激により mRNA および蛋白レベルで増強した。また、好中球の G-CSF による生存延長は Janus kinase (JAK) 2 の特異的阻害剤である AG490 で有意に抑制された。一方、G-CSF による好中球の signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化ならびに cIAP の発現増強が AG490 により有意に抑制された。

以上の結果より、G-CSF は好中球の cIAP 発現を JAK2-STAT3 系を介して増強することにより、生存を延長することが明らかとなった。

## 24. $Cl^-$ -free 溶液による胃幽門腺粘液細胞開口放出の増強

○加藤益美, 藤原祥子, 中張隆司 (大阪医科大学 第一生理学)

胃幽門腺粘液細胞の  $Ca^{2+}$  調節性開口放出は細胞容積減少により増強される。細胞容積減少は細胞内  $Cl^-$  濃度 ( $[Cl^-]_i$ ) の減少を引き起こすことが知られており、今回  $Ca^{2+}$  調節性開口放出に対する  $Cl^-$ -free 溶液の効果について検討した。モルモット胃幽門腺粘膜をコラゲナーゼ処理し、得られた遊離腺を用い、ビデオ顕微鏡下に観察した。実験に用いた  $Cl^-$ -free 溶液は  $Cl^-$  を  $NO_3^-$  に置換した。アセチルコリン ( $10 \mu M$  ACh) は二相性 (初期相および定常相) の  $Ca^{2+}$  調節性開口放出を引き起こす。  $Cl^-$ -free 溶液は ACh ( $10 \mu M$ ) による開口放出の初期相を約 2 倍に増強した。また Bumetanide ( $20 \mu M$ ) も、ACh ( $10 \mu M$ ) による開口放出を約 1.5 倍に増強した。また  $Cl^-$ -free 溶液および Bumetanide は開口放出頻度の ACh 濃度依存性を低濃度側へシフトさせた。このように  $Cl^-$ -free 溶液の効果は Bumetanide によって再現された。以上の結果から、  $Cl^-$ -free 溶液による  $Ca^{2+}$  調節性開口放出の増強は細胞内への  $Cl^-$  の減少 ( $[Cl^-]_i$  の減少) により引き起こされていることが示唆された。

## 25. 心筋細胞におけるミトコンドリアモデルの構築とエネルギー代謝シミュレーション

齊藤隆太<sup>1</sup>, 皿井伸明<sup>2</sup>, 松岡 達<sup>2</sup> (<sup>1</sup>三菱ウェルファーマ株式会社, <sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科)

生化学的実験から, 心筋細胞ミトコンドリアにおいて,  $\text{Ca}^{2+}$  は TCA 回路中の脱水素酵素や ATP 合成酵素を活性化し, ミトコンドリア ATP 産生能を制御することが示されている. また, ミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  が生理的条件下に変動することが知られている. しかしながら, 心筋興奮—収縮連関における  $\text{Ca}^{2+}$  変動と, ミトコンドリア機能との関係は完全には解明されていない. 我々は, この問題について, コンピュータシミュレーションを用いて検討した. 酸化のリン酸化によるエネルギー代謝を組み込んだ心筋細胞の興奮—収縮連関モデル (Kyoto model) (Matsuoka *et al.*, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **85**, 279, 2004) に, ピルビン酸脱水素酵素などの  $\text{Ca}^{2+}$  依存的な脱水素酵素群を含む TCA 回路諸反応と, ミトコンドリアにおける  $\text{Ca}^{2+}$  ユニポート,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換を追加したモデルを完成させた. 定常状態において, エネルギー代謝物濃度は実験データに近い値に安定した. シミュレーションの結果, 生理的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇によって, ミトコンドリア ATP 産生能が活性化され得ることが示された.

## 26. カプサイシン誘起内臓痛における PAR-1 および PAR-2 の役割

○河尾直之<sup>1,2</sup>, 池田久雄<sup>2</sup>, 岡田清孝<sup>1</sup>, 岡本知可子<sup>1</sup>, 上嶋 繁<sup>1,3</sup>, 松尾 理<sup>1</sup>, 川畑篤史<sup>2</sup> (<sup>1</sup>近畿大・医・第二生理, <sup>2</sup>薬・生体機能病因解明, <sup>3</sup>農・臨床栄養)

【目的】Protease-activated receptor (PAR) は生体内に広く分布し, 様々な役割を果たしている. 体性痛の制御において, 感覚神経に発現する PAR-1 は鎮痛的に, PAR-2 は促進的に働くことが報告されている. 今回はカプサイシン誘起内臓痛モデルを用いて, 内臓痛における両受容体の役割について検討した. 【方法】ddY マウスを使用し, 内臓痛様行動の観察は薬物の結腸内投与直後より 30 分間行った. von Frey filament によりマウス下腹部を刺激することによってアロディニア (異痛) を測定した. 【結果】カプサイシンの結腸内投与は, 著明な内臓痛様行動とアロディニアを誘起した. PAR-1 アゴニスト腹腔内投与はカプサイシン誘起内臓痛様行動を有意に抑制した. 一方, PAR-2 アゴニスト結腸内投与は, カプサイシン誘起内臓痛反応を遅発性に増強した. 【考察】PAR-1 は内臓痛に対して抑制的に働くことが明らかになった. 一方, 結腸内腔に発現する PAR-2 は, その活性化により遅発性にカプサイシン受容体の感受性を亢進させ, 内臓痛を促進すること

が示唆された.

## 27. ラット培養骨髄間質細胞における P2Y<sub>2</sub>型プリン受容体を介したカルシウムシグナリングと細胞密度の関連

○市川 純, 玄番央恵 (関西医科大学・第2生理)

本研究で骨髄間質細胞に P2Y<sub>2</sub>型プリン受容体が存在することを確認したので報告する. 骨髄内の造血系細胞ではプリン受容体の存在が報告されているが, 骨髄間質細胞における報告は未だにない. F344 雄ラット大腿骨骨髄より採取し培養した骨髄間質細胞において, カルシウム蛍光色素 Fura-2 を用いプリン受容体アゴニスト刺激時の細胞内カルシウム濃度変化を測定したところ, UTP がカルシウム上昇を引き起こすことを見出した. このカルシウム上昇は細胞外液からカルシウムイオンを除去しても同様に起こったこと, さらに他のヌクレオチドとの作用強度の比較検討から考え, Gタンパク共役型プリン受容体の一つである P2Y<sub>2</sub>受容体の発現が推定された. そこで抗体を用い免疫組織化学的に検討すると, P2Y<sub>2</sub>受容体の発現が確認できた. さらに, この受容体を介したカルシウムシグナリングが細胞密度によって変化することが判明した. これらの結果は, 再生医療の有用な材料として注目されるようになったにも関わらず, イオンチャネルや受容体の解析が他の細胞種に比べ立ち遅れている骨髄間質細胞研究に新しい知見をもたらすと考えられる. つまり効率的に細胞を増やす為の最適培養条件の決定や, あるいは生体骨髄内環境の維持における骨髄間質細胞の役割を考察する上で役立つ可能性がある.

## 28. 複数体部同時動作における発揮筋力低下特性

○佐藤 元<sup>1,2</sup>, 前田芳信<sup>1</sup>, 姜 英男<sup>2</sup> (<sup>1</sup>大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部, <sup>2</sup>大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学講座)

【目的】複数体部の同時筋力発揮において, 一側の体部で単独に筋力発揮した場合に比べて有意な筋力低下が報告されている. 一方, 上肢外転筋力が歯の噛みしめにより抑圧をうけることが観察されている. 今回その抑圧の機序を明らかにする目的で研究を行った. 【方法】三角筋中部, 僧帽筋および咬筋より筋電図を記録し RMS (root mean square) およびパワースペクトルを求めた. 【結果と考察】三角筋, 僧帽筋については, 歯の噛みしめに伴い RMS の低下が認められた. また, 筋電図周波数解析において, 三角筋では低周波帯および高周波帯の両成分の減少が認められたが, 僧帽筋では低周波帯成分の増強および高周波帯成分の減少が認められた. これらのことから, 僧帽筋においては, 筋力発揮に伴って速筋線維が疲労した結果, その代

償作用として遅筋線維の活動が増強し、筋疲労時に特徴的なパワー周波数の低周波帯域への移行が生じたと考えられた。しかしながら、三角筋においては、両周波帯成分ともに抑圧されたことから、明らかな拮抗関係にない両筋群間に相反抑制様の機構が働いた可能性が示唆される。今後どのような神経回路がこうした抑制に関与するのかを明らかにする必要がある。

### 29. cGMP modulation of ACh-stimulated exocytotic events in guinea-pig antral mucous cells

Adel H. Saad<sup>1</sup>, Takashi Nakahara<sup>3</sup>, Masumi Kato<sup>3</sup>, Shoko Fujiwara<sup>3</sup> and Yoshinori Marunaka<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>Dept. of Molecular Cell Physiology and <sup>2</sup>Dept. of Respiratory Molecular Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine, and <sup>3</sup>Dept. of Physiology I, Osaka Medical College)

In antral mucous cells, acetylcholine (ACh) stimulates the Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytotic events, which consists of two phases: an initial transient phase followed by a sustained phase. In the present study, the effects of cGMP on ACh-stimulated exocytotic events were examined in guinea-pig antral mucous cells.

Guinea-pigs were anaesthetized with inhalation of ether. Antral mucosa was removed from the animal, and the antral mucous cells were isolated by collagenase treatment. The exocytotic events were observed using video microscopy.

ACh increased the frequency of exocytotic events mediated by [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in a dose dependent manner. 8Br-cGMP alone did not induce any exocytotic events, however it enhanced the ACh-stimulated exocytotic events. In BAPTA-loaded cells, ACh did not induce any exocytotic events in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup>, and the further addition of 8Br-cGMP also did not. 8Br-cGMP shifted the ACh dose-response curve to the upper side, especially at higher concentrations. Depletion of cytosolic ATP, which inhibits the priming step, eliminated the initial phase, while in 8Br-cGMP pretreated cells it did not eliminate the initial phase. In conclusion, cGMP enhanced the ACh-stimulated exocytotic events by modulating the ATP-dependent priming step.

### 30. 海馬ニューロン軸索ガイダンスにおけるセマフォリン4A分子の役割解析

湯川和典, 坪田裕司, 真壁恭子, 前田正信 (和歌山県立

医科大学生理学第二講座)

セマフォリンはニューロンネットワーク形成過程で軸索を標的細胞まで伸長していく軸索ガイダンスに作用する因子であり20種を超えるファミリーが存在する。セマフォリン4A (Sema4A) はリンパ球活性化に必須の役割を担うが、神経系におけるSema4Aの役割の詳細は不明である。Sema4Aの発達期海馬ニューロン・成長円錐 (growth cone) に対する機能を明らかにするために、胎生17日齢マウス由来の培養海馬ニューロンにレコンビナントSema4Aを添加してgrowth cone collapse assayを行った。その結果、レコンビナントSema4Aは有意な成長円錐の崩壊を誘導することが判明した。Sema4Aで誘発される成長円錐崩壊はRhoキナーゼ・インヒビターのY-27632添加により阻止された。免疫細胞化学解析により海馬ニューロン成長円錐へのレコンビナントSema4A分子の結合が証明された。従って、Sema4Aは海馬ニューロン膜上の受容体を活性化して化学発癌因子として機能する結果、抑制的ガイダンスシグナルとして作用することが示唆された。またSema4Aが海馬ニューロン成長円錐崩壊を誘導する際の細胞内シグナルとしてRhoキナーゼの活性化が示唆された。

### 31. ラット延髄孤束核へ微量注入された des-acyl-ghrelin は循環調節に作用する

坪田裕司, 真壁恭子, 湯川和典, 前田正信 (和歌山県立医科大学・医・第二生理)

des-acyl-ghrelin (DAG) は脳腸ペプチドであるghrelinからオクタン酸の修飾が外れた分子で、ghrelinの受容体である成長ホルモン分泌促進因子受容体 (GHSR-1a) には結合しない。しかしながら、DAGは脂質代謝やアポトーシスに作用することから別の受容体の存在が示唆されている。また、その循環調節への具体的な作用は不明である。今回、DAGをこれまでに報告のないラット延髄孤束核 (NTS) の循環調節領域に微量投与し、血圧心拍数の変化を指標としてその効果を検討した。その結果、調べた40と80 pmol/100 nlの濃度において有意な血圧心拍数の低下を確認した。DAGの受容体は未解明であるが、DAGのラットNTSにおける循環調節への関与が示された。私達は前回の生理学会でNTSにおけるghrelinの興奮性作用を報告したが、DAGもまた、その反応からNTSの神経を興奮性に刺激して血圧低下をもたらす興奮性の調節因子として作用していることが示唆された。

### 32. カルベジロールがATP感受性カリウムチャネルとG蛋白質制御カリウムチャネルのポアを阻害する

菊田順一, 石井 優, 岸本健太郎, 倉智嘉久 (大阪大・医・情報薬理)

【背景】カルベジロールは今日最も汎用されている $\beta$ 遮断薬の一つである。近年, これが $\beta$ 受容体拮抗作用のみならず, 種々の電位依存性イオンチャンネルを抑制することが報告されている。今回我々は心筋に発現する3つの内向き整流性カリウムチャンネル(Kir)(古典的内向き整流性カリウムチャンネル( $I_{K1}$ ), ATP感受性カリウムチャンネル( $K_{ATP}$ ), G蛋白質制御カリウムチャンネル( $K_G$ )に対するカルベジロールの効果について検討した。

【結果】カルベジロールは心筋細胞に発現する $K_{ATP}$ ( $IC_{50} \sim 1.1 \mu M$ )及び $K_G$ チャンネル( $IC_{50} \sim 3.7 \mu M$ )を濃度依存性に抑制したが,  $I_{K1}$ に対しては全く抑制効果を示さなかった( $> 10 \mu M$ )。またカルベジロールはHEK293細胞に $K_{ATP}$ のポアのみを発現するKir6.2 $\Delta$ C26を過剰発現したのものにも同程度の抑制効果を示した。また $K_G$ チャンネルはGTP $\gamma$ Sで不可逆的に活性化した場合でも抑制した。

【考察】以上よりカルベジロールは3つのKirのうち,  $K_{ATP}$ や $K_G$ チャンネルのポアを阻害することが示唆された。カルベジロールはKirチャンネルのポア部分に作用するが, ある特異性をもつことが分かった。

### 33. 脳アストロサイトにおける内向き整流 $K^+$ チャンネル Kir4.1・Kir5.1の分布と局在

日比野 浩, 藤田秋一, 岩井香織, 山田充彦, 倉智嘉久 (大阪大学・医・情報薬理)

内向き整流 $K^+$ (Kir)チャンネルサブユニットであるKir5.1は脳に多く発現しているが, その詳細な分布や機能は不明である。網膜ミュラー細胞ではKir5.1はKir4.1と共存しているので, 今回我々は, Kir5.1とKir4.1の生化学的・組織学的解析を脳アストロサイトについて行った。免疫沈降法により, 脳にはKir4.1/5.1ヘテロ複合体とKir4.1ホモ複合体の少なくとも2つのチャンネルが発現していることが判明した。免疫染色法にて, 2つのチャンネルは領域特異的に異なった分布パターンを示すことを見出した。即ち, ヘテロ複合体は前脳皮質や嗅脳系球体, ホモ複合体は海馬や視床に分布していた。これらのチャンネルは軟膜直下・血管周囲・神経周囲を取り囲むアストロサイトの突起に局在していた。更に両チャンネルはPDZドメイン蛋白であるsyntrophinと結合するので, この蛋白がアストロサイトにおいてチャンネルの局在決定に関わっていることが示唆された。Kir4.1/5.1ヘテロ複合体, Kir4.1ホモ複合体は異なった電気生理学的特性を示すので, これら各々のチャンネルは脳アストロサイトの $K^+$ -buffering作用において, 特有の機能を果たしていると考えられた。

### 34. セルアナライザー“クオンタ”を用いた細胞内クオライド濃度測定系の確立

宮崎裕明, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院 医学研究科 生理機能制御学)

我々は, 低浸透圧刺激時の調節性細胞容積減少(RVD)を介した細胞内 $Cl^-$ 濃度( $[Cl^-]_i$ )変化がtyrosine phosphataseの活性化を制御し, 腎遠位尿管 $Na^+$ 再吸収に関与する上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)の遺伝子発現を増大させることを報告した。さらに,  $[Cl^-]_i$ が細胞増殖・細胞骨格系構築を含む様々な細胞機能制を行っており, 細胞内シグナルとしての $[Cl^-]_i$ の重要性が明らかになってきた。しかしながら, 従来の $Cl^-$ 電極や $Cl^-$ indicatorを用いた蛍光顕微測光による $[Cl^-]_i$ 測定には操作性や正確度に問題があった。本研究において, 細胞の容積と蛍光を同時に計測可能なセルアナライザー“クオンタ”を用い,  $Cl^-$ indicatorであるMQAE蛍光を測定することによる $[Cl^-]_i$ 測定法の確立を試みた。低浸透圧刺激時における細胞容積と $[Cl^-]_i$ の変化をクオンタにより同時測定し, RVD惹起時における $[Cl^-]_i$ の継時的な減少が容積減少とともに観察できた。このようにクオンタを用いた $[Cl^-]_i$ 測定法を用いることで, 様々な細胞機能に対する細胞内 $Cl^-$ の果たす役割が解明できるものと考ええる。本研究は文科省科研費15659052・15790120/日本学振15590189により行なわれた。

### 35. 心虚血再灌流傷害に対するループ利尿薬の効果～細胞モデルを用いた考察～

竹内綾子, 松岡 達, 野間昭典, 乾 賢一 (京都大学細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト)

ループ利尿薬は $Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送体(NKCC)の特異的阻害剤であり, 心虚血再灌流傷害に対して保護効果をもつことが報告されている(Ramasamy *et al.*, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H515, 2001)。そこで, 心筋細胞モデル(Kyoto model)を用いて論文の実験結果の再現を試みると共に, 論文で提唱された仮説の妥当性について検討を行った。

細胞モデルによって, 虚血再灌流時における細胞内イオン濃度やエネルギー代謝の変化を再現することができた。しかし,  $[Na^+]_i$ 上昇に対するNKCC1阻害による抑制効果は認められなかった。従って, ループ利尿薬によるイオンバランスの保持効果は, NKCC1の阻害のみでは説明できないことが明らかとなった。一方, 論文では考察されていないが, NKCC1の阻害が, 虚血による細胞容積の増大を著しく抑制することがシミュレーションから明らかとなった。従って, ループ利尿薬が細胞を機械的な傷害から保護

している可能性が示唆された。

以上、細胞モデルの利用によって、病態時や薬物投与時における生体内バランスの変化を定量的に捉え、薬物作用メカニズムをより理論的に解析することが可能になると考える。

### 36. W/W<sup>v</sup>変異マウス小腸の自発的電気活動と収縮

中川 正<sup>1</sup>、上島成幸<sup>1</sup>、藤井久男<sup>2</sup>、中島祥介<sup>2</sup>、高木都<sup>1</sup> (<sup>1</sup>奈良県立医科大学・第二生理学、<sup>2</sup>同・消化器総合外科)

カハールの介在細胞 (ICC-MY) が欠損する W/W<sup>v</sup>変異マウス小腸の電気活動と輪走筋・縦走筋の収縮を同時記録し、腸管自発運動に対するカハールの介在細胞と腸壁内神経系の関わりを検討した。+/+マウス (Wild-type) では縦・輪走筋の同期した規則的な運動と、これに対応した slow wave と spike potential が記録された。これらの運動、電気活動の周期は L-NAME (NOS inhibitor) や Tetrodotoxin (TTX) に影響されなかった。W/W<sup>v</sup>変異マウスでは slow wave は記録されず、活動電位を伴う不規則な運動が記録された。回腸の縦走筋収縮の間隔は、L-NAME 投与により  $2.92 \pm 0.29$  秒から  $2.06 \pm 0.24$  秒と有意に短縮することがわかった。変動係数 (SD/mean) は  $2.17 \pm 1.15$  から  $0.29 \pm 0.05$  と有意に小さくなった。TTX の投与でもほぼ同様の結果が得られた。これらの結果から、腸管運動は ICC-MY の欠損下では腸壁内神経系による抑制

が強くなっていることが示唆された。さらに+/+マウスと W/W<sup>v</sup>変異マウス回腸の ICC と腸壁内神経系を免疫染色し+/+形態学的に比較した。

### 37. 心筋細胞における Cl<sup>-</sup>輸送と細胞容積調節

寺島啓介、松岡 達、野間昭典 (京都大学・細胞生体機能シミュレーションプロジェクト)

細胞膜を介する Cl<sup>-</sup>の輸送は、膜興奮性のみでなく、細胞容積の調節に重要な役割を果たしている。これらの機能を解析する目的で、心筋細胞の数学モデルに NKCC (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter)、VRCC (Volume regulated Cl<sup>-</sup> channel)、CFTR (c-AMP activated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) channel などの機能モデルを実装してシミュレーションを行った。まず、イオンチャネルを介する膜フラックスと、輸送体によるフラックスが釣り合うよう、実験データを参照し、定常状態を設定した。実験で、心筋細胞にあらかじめ低浸透圧液を与えて、細胞容積が増大しているとき、カテコラミン刺激で CFTR チャネルを活性化すると、細胞容積が減少することが示されているが、モデルはこれを良く再現した。また、Na/K pump を阻害した際には、一定時間の遅れの後に細胞容積が Cl<sup>-</sup>濃度の上昇に平行して上昇した。これらの結果から、心筋細胞では、膜を介する Cl<sup>-</sup>輸送は主に細胞容積調節に寄与していることが結論された。