

第55回西日本生理学会

日 程：平成16年10月15日（金）11：00～12：00 評議員会
 13：00～18：08 口演発表（24演題）
 18：15～ 総会
 19：00～ 懇親会
 16日（土）9：00～16：34 口演発表（32演題）
 会 場：福岡大学60周年記念館（ヘリオスプラザ）3F ヘリオスホール
 当 番：福岡大学医学部生理学教室
 参加者：125名
 演題数：56題

第55回西日本生理学会では、いくつか新しい試みを行なった。従来、評議委員会は総会と同時に開催していたが、十分な審議討論のことを鑑み、初めての試みとして評議員会を総会とは別にして初日の午前中に行なった。約30%の出席率（名誉教授以外の評議員）で、総会ではみられない活発な審議討論が行なわれた。この結果を総会で報告、承認する形とした。常任幹事会、広報委員会、学術・研究教育委員会、研究倫理委員会、賞選考委員会からの報告があり、九州地区から委員が出ていない委員会で重要なものは常任幹事が代わって報告した。議題では英語発表、大会参加費、科研分科細目、地方会の在り方～西日本生理学会の在り方について討論した。その中で、西日本生理学会の在り方にいろいろな意見が出たが、参加費の問題（3段階にすること）、今回のように非会員（comedical fieldなど）にも広く参加を求めること、若者を対象に「賞」を企画することなどが承認された。総会では評議委員会報告、承認と意見交換を行ない、簡潔を旨とし30分程度で終了した。総会の出席者もかなり多かった。

今回は、生理学会非会員も評議員の推薦のもとに発表可能としたこともあり、多くの若者の参加が目立った。発表者の約80%は、大学院生（40%）、研究生、助手など若い研究者が占め、若い研究者の登竜門としての地方会の所期の目的は果されているものと思われる。参加者がいろいろの分野の発表を聴くことが出来るように1会場開催とし、かつ全て口頭発表で行なうことにしたので、時間の制限もあり1題12分の発表となった。しかし、それなりにまとまった発表であった。若者が積極的に質疑していたことが印象的であった。尚、座長は、西日本生理学会の伝統でもあるが、助教授、講師にその労をとって頂いた。発表は全て、PC、液晶プロジェクターを使用した。トラブルは1件もなく、万事順調に進行した。次回は当番校、九州歯科大学生理学のもと平成17年10月21、22日に開催予定である。

1. コイの心拍動及び呼吸運動に対する環境ストレスの影響

松永知恵，木本恵理子，土屋勝彦，田井村明博（長崎大学・環境科学部・自然環境保全講座）

実験室の水槽内で飼育されている体長約30cmのコイの腹腔にテレメーター発信器を慢性的に装着した。心臓及び下顎の皮下に記録電極を固定し、心電図及び呼吸運動に関連した電位変化を誘導し、心拍動及び呼吸運動をモニターした。水温は23℃から24℃の範囲で一定とし、室内の照明は蛍光灯で行い12時間/12時間の明暗サイクルとした。水槽ガラス面を手指で軽く叩く（Tapping）、照明の

点灯・消灯等の環境刺激の心拍動及び呼吸運動に対する影響を検討した。Tappingは心拍動及び呼吸運動の一過性の抑制をもたらした。照明の突然の消灯及び点灯も心拍動及び呼吸運動の一過性の抑制をもたらした。照明の切り替えの後には激しい遊泳運動を誘起することがあった。アトロピンの投与（1mg/kg, i.p.）によって心拍数は増加し、より規則的になった。アトロピン投与後、Tappingによる心拍動の抑制は消失した。本研究において、Tapping及び照明の急激な変化などの環境ストレスにコイは敏感に反応し、心拍動及び呼吸運動の一過性の抑制反応を示すことが明らかになった。ストレス刺激に対する心拍動の停止又は

抑制反応は主として迷走神経の抑制作用によることが示唆された。

2. サルの視覚的弁別機能に及ぼす内外界ストレスの影響

高良沙幸, 井上貴雄, 水野雅晴, 粟生修司 (九州工大院・生命体・脳情報・高次脳機能)

社会的な状況下におけるストレスがサルの高次脳機能にどのような影響を及ぼすかわかるため, 社会的ストレスと内外界環境変動によるストレスの影響を比較検討した。アカゲザル3頭を用い, ケージ内で視覚的カテゴリー弁別課題を訓練し, 図形—文字, 食物—非食物, 雄ザル—雌ザルをカテゴリーに基づき80%以上の正解率を示すまで訓練した。学習が完成した状態で種々のストレスを負荷した。痛み刺激やモンキーチェアによる拘束などの物理的なストレスはカテゴリー弁別機能を一過性に抑制した。モンキーチェア上での拘束に慣れるに従い, カテゴリー弁別課題遂行能力は逆に上昇した。性周期における内分泌学的変動では, 月経期にのみ弁別機能が低下した。社会的ストレスとして闘争反応を誘発する同性のサルを隣接させると, 恒常的に課題遂行能力が低下し, 正解率も大きく変動した。痛みや拘束などの物理的ストレスは反復負荷で慣れが生じる可能性が示唆された。一方, 月経時の体内環境や他のサルから与えられる社会的ストレスは恒常的にカテゴリー弁別機能などの高次脳機能に抑制的な作用を及ぼすことが明らかになった。

3. ストレスに対する内分泌反応への脳内 Prolactin-releasing peptide の関与

米良貴嗣¹, 藤原広明¹, 岡 孝和², 辻 貞俊², 上田陽一¹ (¹産業医科大学 第一生理学, ²神経内科学)

【目的】Prolactin-releasing peptide (PrRP) は prolactin の放出作用に加え, ストレス反応への関与が報告されている。今回, 我々はラットの PrRP の中枢内投与による脳内 CRF ニューロンの活性化及びストレス負荷による PrRP 産生の増加を検討した。【方法】Wistar 系成熟雄ラットを使用した。実験1: PrRP (10 μ g/rat) を脳室内に投与し, Fos 蛋白及び CRF の二重免疫組織化学的染色を行った。次に PrRP (2, 10 及び 30 μ g/rat) の脳室内投与と30分後に断頭, さらに PrRP (10 μ g/rat) の脳室内投与15, 30, 60 及び 180分後に断頭した。実験2: 30分間の拘束, 2時間後に断頭した。また lipopolysaccharide (LPS) (5mg/kg 体重) を腹腔内投与, 12時間後に断頭した。in situ ハイブリダイゼーション法にてそれぞれ c-fos mRNA 及び延髄 PrRP mRNA を検出した。【結果】PrRP 投与群

の室傍核 (PVN) の CRF 陽性ニューロンの約80%が Fos 蛋白陽性で, 有意な増加を示した。PrRP 投与群の PVN のみで c-fos mRNA の有意な増加を認めた。拘束及び急性炎症ストレスを加えたラット延髄の PrRP mRNA の有意な増加を認めた。【結論】ラット延髄 PrRP は拘束及び急性炎症ストレスで増加し, ストレスによる HPA axis の賦活化に関与していることが示唆された。

4. ニューロメジン U (NMU) の反射機構および環境適応への関与

村上 昇¹, 江木 裕¹, 井田隆徳¹, 中原桂子¹, 花田礼子², 児島将康² (¹宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理, ²久留米大遺伝情報)

NMU は豚脊髄から単離された23個のアミノ酸からなるペプチドで, その受容体が中枢にも存在することから, その役割が注目されている。我々は NMU の摂食抑制作用や概日リズム機構へ関与をすでに報告したが, 今回, NMU-KO マウスにおいて, 反射機構の低下が観察されたので, その検討を行った。NMU-KO マウスとワイルドマウスにおいて, 58度の熱プレートでの熱反射機能, あるいは2%ホルマリンを footpad に投与した時の痛み反射機能を比較したところ, KO マウスにおいて顕著な機能低下が認められた。一方, NMU の脳室内投与はこれらの反射機能を促進した。この時, 視床下部, および弧束核や脊髄後角において Fos 蛋白質が発現した。次に, 23度から37度への飼育環境温度の変化に対する心拍数や血圧の変化, また明暗条件を急に変化した時のリズムの再同調速度, エーテル暴露時の副腎皮質ホルモン変化を比較したところ, いずれも KO マウスの適応が低下していた。以上の結果から, NMU は反射や適応機能に重要な役割を果たしていると推測された。

5. 内分泌攪乱物質ビスフェノール A の胎生期曝露はニオイに対する行動および神経応答に影響を与える

藤本哲也¹, 久保和彦², 粟生修司¹ (九州工大院・生命体・脳情報, ²千鳥橋病院耳鼻咽喉科)

これまでの研究で我々は, 耐容1日摂取量以下のビスフェノール A (BPA) の胎生期曝露が成長後の仔ラットの探索行動の性差を消失させ, 不安・うつ反応を増強することを見出した。これにより胎生期の重要性とともに, オープンフィールド試験や強制水泳試験の鋭敏な評価機能を明らかにした。本研究では BPA の情動反応への影響をさらに検討するため, 捕食者のニオイに対する警戒反応を検討した。また, BPA に高い感受性を有し, 嗅覚情報処理に関与している扁桃体内側核領域の機能異常を検討した。キ

ツネ (捕食者) 由来のニオイに対する回避行動を調べた結果、BPA曝露群でキツネのニオイ存在下での活動量が抑制され、ニオイ物質に対する回避行動が有意に促進した。また、扁桃体内側核ニューロンの嗅覚応答を細胞外記録法で調べた結果、対照群では興奮性応答が雌よりも雄で有意に多く記録されたが、曝露群ではこの性差が消失した。

ビスフェノール A の胎生期曝露が、不安やうつだけでなく、警戒反応も増強すること、情動反応に重要な役割を果たしている扁桃体の機能的性分化を障害することが明らかになった。

6. ホルムアルデヒドの慢性曝露はマウスの不安を引き起こす

竹田勝一¹、櫻田尚樹²、笹田由紀子²、粟生修司¹ (九州工大・生命体・脳情報、²産業医大・産業保健)

環境化学物質の慢性曝露により、頭痛、眩暈、不安、吐き気などの自律神経症状やうつなどの精神症状が発生することがあり、化学物質過敏症と呼ばれている。ホルムアルデヒドは、強い刺激臭があり、家の建材の原料などにも用いられ、化学物質過敏症の主因物質として知られている。本研究では、2ppmのホルムアルデヒド12週間慢性曝露の成熟マウスに与える影響を行動実験の手法を用いて調べた。行動評価には、オープンフィールド試験、高架十字迷路試験、ラッシュレー III 迷路試験、受動的回避学習試験、ホットプレート試験を用いた。その結果、ホルムアルデヒド慢性曝露群は、対照群よりも高架十字迷路試験において、オープンアームでの移動距離や滞在時間が減少し、不安を示す行動も増加した。受動的回避学習試験では暗室移行潜在時間がホルムアルデヒド慢性曝露群の方が7倍長かった。一般活動性、空間学習、痛覚閾値には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、ホルムアルデヒド曝露群は対照群よりも不安情動が高く、回避学習能が高いことを示す。化学過敏症の主要症状の一つとして不安が報告されており、本研究の曝露マウスが化学過敏症のモデルとして有用であることが示唆される。

7. ラット学習機能に及ぼす植物の香りの影響

甲斐義宏、藤本哲也、粟生修司 (九州工業大学大学院生命体工学研究科高次脳機能講座)

香りに種々の精神作用があることが示唆されているが、そのメカニズムについては不明の点が多い。本研究ではヒトで覚醒作用が認められているレモンとローズマリーの精油を用い、学習能へ及ぼす影響を行動課題および脳血流を調べて評価した。学習課題としてラッシュレー III 迷路試験及び受動的回避学習試験を用いた。精油は triethyl citrate

に溶解し、10%希釈溶液として曝露ケージ内に散布し、学習試験施行前の少なくとも30分間ならびに試行間期に暴露した。ローズマリーの香りは、ラッシュレー III 迷路試験におけるゴール到達所要時間、後戻り所要時間ならびに袋小路進入回数を有意に短縮し、空間学習能を促進した。回避学習能には影響しなかった。精神安定化作用、抗不安・抗うつ作用が報告されているレモンの香りは、何れの学習試験でも効果を示さなかった。ローズマリーの香りは食欲や活動性には有意の影響を及ぼさず、空間学習課題に対する促進作用は報酬獲得動因や運動機能の上昇によるものではなく、空間学習能を直接的に促進していることが示唆された。脳血流に及ぼす影響を調べると、扁桃体内側領域および海馬歯状回で脳血流が増加した。とくに扁桃体内側領域でローズマリーの香りに対する選択的応答が認められた。

8. 幼若ラットにおいて記憶形成における神経幹細胞の関与

宗 謙次^{1,2}、守屋孝洋¹、西谷正太¹、高橋晴雄²、篠原一之¹ (長崎大院・医歯薬・神経機能、²長崎大院・医歯薬・耳鼻咽喉病態制御)

近年の研究で、哺乳類の生後の脳においても神経幹細胞からの神経新生が活発に起きていることが明らかとなっており、その代表的な部位の一つに側脳室下帯があり、そこからの新生神経は嗅球にまで供給されていることがわかっている。そこでわれわれは、新生仔期の匂い記憶形成における、側脳室下帯の神経幹細胞からの神経新生の関与について調べた。シトラル臭を条件刺激、電撃ショックを無条件刺激とする連合学習を新生ラットに与えると、2週間にわたり持続する長期嫌悪学習が成立した。そこで、において記憶獲得時 (学習翌日) および、において記憶成立時 (学習2週間後) における新生神経の動態を、増殖細のマーカである bromodeoxyuridine (BrdU) をもちいた蛍光免疫組織化学染色法により調べた。その結果、において記憶獲得時には、側脳室下帯の神経幹細胞の増殖能が増加し、において記憶成立時には嗅球の新生神経数が増加した。以上の結果より、新生期の匂い記憶において神経幹細胞からの神経新生が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

9. 猫グレリンの構造決定と、その生理作用について

井田隆徳¹、宮里幹也²、佐々木 睦¹、山崎まゆ¹、安田達司¹、中原桂子¹、村上 昇¹、海谷啓之²、寒川賢治² (宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理、²国立循環器病センター生化学)

近年、人およびラットの胃より同定されたグレリンは、

N末端より3番目のSerに脂肪酸（オクタン酸）がエステル結合している珍しいペプチドであり、成長ホルモン（GH）分泌促進作用のみならず、強力な摂食促進作用を有する。そのため、過食/拒食症の研究、あるいは治療への応用が期待されている。近年、猫でも肥満や摂食障害は重要な問題であるが、未だ、猫グレリンの構造は不明である。今回、猫グレリンを胃から精製し、その構造の決定を試みた。人やラットと高い相同性を示す28個のアミノ酸からなるペプチドが主として単離されたが、猫ではN末端より14番目のGln、28番目のArgのいずれか、あるいは両方が欠損したものが存在した。分子量からの推測で、側鎖脂肪酸はオクタン酸に加え、カプリン酸、他、複数存在することが判明した。次に、猫にグレリンを静脈内投与したところ、用量依存性に血中GH濃度の増加が認められた。また、猫の血中グレリン測定において、絶食により上昇する傾向が認められた。以上の結果より、猫グレリンは主として、人やラットと高い相同性を有する28個のアミノ酸からなるが、単一ではなく、幾つかのアミノ酸の欠損したものが、異なる脂肪酸が結合したものが存在することが判明した。また、グレリンは猫においてもGH分泌や摂食行動に関与している可能性が示唆された。

10. グレリンとニューロメジンU (NMU) の中枢作用機序について

阿部信介, 片山愛子, 中原桂子, 村上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理)

グレリンとNMUはそれぞれ摂食促進および抑制ホルモンとして知られているが、その作用機序については未だ明らかにされていない。これらの末梢、および中枢投与後の弓状核における種々の摂食関連遺伝子（NPY, AGRP, POMC）mRNA発現を検討した。またin vivoで室傍核挿入電極におけるMUA電気活動、およびin vitroで多電極ディッシュを用いた弓状核スライスの各部位における電気活動を、グレリンやNMU投与前後で比較した。その結果、グレリンやNMUの末梢投与と中枢投与時では、弓状核のNPY, AGRP, POMC遺伝子mRNA発現量が種々異なることが判明した。また室傍核のNMU電気活動はグレリン投与において発火頻度が増加し、NMU投与によって減少する傾向が示された。また、NMU投与では促進系の結果も一部示された。弓状核スライスにおいてグレリンは発火頻度を上昇させる部位が存在することが示唆された。以上の結果から、新規摂食関連ペプチド、グレリンおよびNMUは弓状核において摂食関連遺伝子発現を調節していること、その発現は末梢投与と中枢投与で異なることが判明した。さらに、これらの投与により室傍核や弓状核の電

気活動が有意に変化することが判明した。

11. シスプラチン（抗ガン剤）誘発の摂食抑制とグルココルチコイドによる改善

松本逸郎, 嶋田敏生, 相川忠臣 (長崎大学・医学部・第一生理)

シスプラチン（CIS, 抗ガン剤）による摂食抑制のメカニズムと改善を図る目的でウイスター系雄性ラットを用いて実験を行った。2mg/kgのCISを腹腔内に二日間投与し自由摂食・自由飲水で摂食量、飲水量、体重を測定した。CISは摂食量を投与前の最大75%（第2日目）、体重を最大8%（第3日目）減少させ6日間の蓄積摂食量をCIS非投与動物の56.6%に抑制した。迷走神経の左側肝臓枝（HVX）、左右の胃枝（GVX）または腸枝（CVX）の選択的切除ではHVXが軽度にCISの効果を軽減したがGVXとCVXは無効であった。迷走神経腹部内臓枝の組み合わせ切除ではHVXにCVXまたはGVXのいずれを組み合わせた切除群でも大きくCISによる摂食抑制と体重減少を軽減した。CVX+GVXの組合せ切除では軽減効果はなかった。横隔膜下での左右の迷走神経全切除ではCISによる摂食抑制はさらに軽減した。メチルプレドニゾロン30mg/kgの腹腔内または150 μ g/kgの第三脳室内投与はCISによる摂食抑制を有意に減弱した。この結果からCISによる摂食抑制には1) 迷走神経肝・門脈枝が優位に関与し、2) 胃枝と腸・膵枝は相加的な効果を有し、3) 迷走神経求心性入力以外の因子が関与する可能性があり、4) メチルプレドニゾロンは腹腔内と脳内で独立してCIS誘発の摂食抑制を軽減することが示唆された。

12. Effect of ghrelin and neuromedin U (NMU) on food intake in Japanese quail

Saad Shousha, 中原桂子, 村上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理)

In this study, we elucidated the central role of ghrelin and NMU in avian species using Japanese quail. There was a significant increase in the plasma levels of ghrelin in Japanese quails in the fasting state; subsequent feeding resulted in a reduction. The ip, but not icv, injections of small doses of ghrelin stimulated food intake. On the other hand, both the ip and icv injections of larger doses of ghrelin inhibited food intake. These results suggest that the effect of peripheral and central ghrelin on the food intake differs in the Japanese quail.

Gene cloning analysis revealed that the amino acid sequence of Japanese quail NMU has high homology with

that of chick, and low homology with that of rat except the C-terminal biologically active region. Both ip and icv administration of synthetic Japanese quail NMU resulted in a significant reduction in food intake and increase in body temperature in Japanese quails. Conversely, the administration of rat NMU into Japanese quail resulted in the opposite effects on both food intake and locomotor activity. These opposite results suggest that rat NMU might act as an antagonist toward the Japanese quail NMU receptor. If so, endogenous NMU may play an important role in the regulation of food intake and body temperature.

13. 雌性ラットの行動・体温リズムに対する性周期およびエストロゲン投与の影響

遠藤 豊¹, 篠原一之², 美津島 大³, 井上真澄¹ (産業医大・医・第2生理,²長崎大院・医歯薬・神経機能,³横浜市大院・医・神経内分泌学)

ヒトを含め哺乳類には体内時計に基づくサーカディアンリズムが存在し、それにより行動、体温、睡眠および種々のホルモン分泌が明瞭な日内リズムを示す。こうしたサーカディアンリズムも性周期の影響を受けることが示唆されており、事実視交叉上核の神経細胞にはエストロゲン、プロゲステロンの受容体が存在することが明らかにされている。そこで今回は成熟雌性ラットを用い、テレメトリーシステムを併用して体温、行動量を測定し、性周期をファクターに入れて検討した。加えて、卵巣摘除、エストロゲン補充投与の効果についても検討した。その結果、行動量、体温ともすべての周期で明期に低く暗期に高い日内リズムパターンを示した。行動量、体温は、特に発情前期暗期より発情期明期にかけて増加した。卵巣摘除により、行動量、体温は低下するが高濃度のエストロゲンの補充投与により回復した。以上よりラットでは、性周期にともない行動、体温のリズムが変動し、特に排卵前後の生殖行動に関連したリズム変化と思われるが、主にエストロゲンの影響が推測される。また卵巣摘除後の体温低下については十分量のエストロゲン補充により回復するが、おそらくは体温セットポイントの上昇をとまなうものと推測される。

14. バゾプレッシンV_{1b}受容体ノックアウトマウスにおける体温と自発活動の日内リズム

大黒理恵¹, 國武孝人¹, 加藤和男¹, 田上昭人², 河南洋¹ (1宮崎大学医学部生理学第一講座, 2国立成育医療センター研究所薬剤治療研究部)

バゾプレッシンV_{1b}受容体ノックアウトマウス (V_{1b}-KO)

と正常マウス (wild) を対象に、代謝量 (体重・飲水量・摂食量・尿量)、テレメトリーシステムによる体温 (BT)・活動量 (AC) の日内リズムを通常飼育条件下、絶水と高NaCl食負荷に対する応答を両者で比較した。代謝測定では、V_{1b}-KOはwildと比べ体重は軽く、摂食量・飲水量・尿量は多かった。V_{1b}-KOの絶水時尿量減少分や高NaCl食時の飲水量・尿量・尿中Na排泄量の増加分が有意に大きいことから、V_{1b}受容体は腎機能調節を修飾する可能性が示唆された。V_{1b}-KOのBT・ACはwildと同様に24時間周期の日内リズムを示したが、wildに比べ明期BTは低く、暗期・明期ACは多かった。絶水・高NaCl食負荷時ともに両群のACに変化はなかった。V_{1b}-KOの絶水時BTはwildに比べ有意に低下した。AVPは体温調節中枢に作用し体温を低下させることが知られている。絶水時に分泌された脳内のAVP量は、高NaCl食負荷時より多いと考えられ、その結果体温低下が誘発されたものと思われる。V_{1b}-KOの明期BTが低いこと、絶水・高NaCl食負荷時に著明にBTが低下することから、V_{1b}受容体は体温調節機能に関与することが示唆された。

15. 神経幹細胞の自己複製能に及ぼす睡眠剥奪の影響

久野高大¹, 守屋孝洋¹, 西谷正太¹, 今井清利², 金 碩煥², 石松隆和², 篠原一之¹ (1長崎大学大学院・医歯薬・神経機能学分野, 2長崎大学工学部・機械システム工学科・機械制御学研究室)

神経幹細胞は自己複製能及び多分化能を有する未分化な細胞である。近年の研究により、成熟哺乳類の脳内にも神経幹細胞の存在が報告されており、成体脳の生理機能と密接な関係があることが明らかになってきた。そこで、われわれは認知機能に影響を与える睡眠に着目し、睡眠剥奪がラット脳内の神経幹細胞の自己複製能に与える影響をBrdU (bromodeoxyuridine) 免疫染色法によって検討した。その結果、トレッドミルを用いた96時間の睡眠剥奪は、側脳室脳室下帯および海馬歯状回の神経幹細胞の自己複製能に影響を与えなかった。一方、睡眠剥奪後の6時間の回復睡眠は、海馬歯状回における神経幹細胞の自己複製能を有意に促進することが観察されたが、側脳室脳室下帯における神経幹細胞には影響を与えなかった。以上の結果より、睡眠が海馬歯状回の神経幹細胞の自己増殖能に影響を及ぼすことが明らかとなった。

16. 新規ペプチド Neuropeptide Wの下垂体後葉系への作用

川崎 展¹, 尾仲達史², 中里雅光³, 藤原広明¹, 上田陽一¹ (1産業医科大学第1生理学, 2自治医科大学生理学,

³宮崎大学医学部第3内科学)

Neuropeptide W (NPW) は、オーファンG蛋白共役型受容体のリガンドとして2002年にブタ視床下部より単離同定された新規ペプチドである。NPWは視床下部神経分泌ニューロンに存在するが、その作用は不明である。今回我々は、NPWの神経分泌ニューロンへの生理作用を明らかにすることを目的とした。ウイスター系成熟雄ラットを用いて、NPW (1および5 μ g/ラット)を脳室内投与し、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて*c-fos* mRNAの検出を行った。さらにNPW (5 μ g/ラット)を脳室内投与し、5, 15, 30, 60および180分後の*c-fos* mRNAを検出し、血漿バゾプレッシン (AVP) およびオキシトシン (OXT) も同時に測定した。また、免疫組織化学的染色法により、Fos蛋白の発現を観察し、AVPおよびOXTとの二重染色も行った。NPWの脳室内投与により、血中AVPおよびOXT濃度が上昇した。また、室傍核 (PVN) および視索上核 (SON) での*c-fos* mRNAはNPW 5 μ g投与時にその発現が認められ、その発現量は投与後30分に最も著明であった。Fos蛋白の発現は、PVNおよびSONにおけるAVPおよびOXT分泌ニューロンの両者に認められた。以上より、NPWはPVNおよびSONの神経分泌ニューロンに作用し、後葉ホルモン分泌を促進することが示唆された。

17. マウス遊離副腎皮質細胞におけるACTHによるコルチコステロン産生のPAF拮抗剤による抑制

広瀬妙子, 相川忠臣, 松本逸郎, 嶋田敏生 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・医学部生理学第一)

マウス副腎から低濃度のトリプシンとコラゲナーゼを用いてインキュベートし、遊離副腎皮質細胞を得た。この系ではACTHによく反応してコルチコステロンが産生された。この系を用いれば各種の免疫異常マウスを用いて副腎機能と免疫の関係を解析することができる。Platelet activating factor (PAF) はマウス灌流副腎では直接コルチコステロンの分泌を促進しないが、PAF拮抗剤SM12502とCV6209の投与でACTHによるコルチコステロン分泌促進を抑制し、その抑制はヌードマウス (ICR nude) では正常マウス (ICR) ほど強くない事を既に報告している。この遊離副腎細胞系でもPAF拮抗剤SM12502とCV6209の投与でACTHによるコルチコステロン分泌促進を抑制したが、その濃度は灌流副腎よりも高濃度を必要とした。その抑制の程度にヌードマウスと正常マウスで違いは見られなかった。皮質細胞のACTHの情報伝達系にPAFが関与する事はより強固に証明されたが、免疫・アレルギーとの接点を見出す手がかりは得られなかった。

18. ラットとモルモット副腎髄質細胞におけるミトコンドリアの違い

井上真澄¹, 藁科 彬², 遠藤 豊¹ (¹産業医大・医・第2生理, ²新潟大院・医歯・細胞生理)

副腎髄質細胞において低酸素が、細胞膜またはその近傍、それともミトコンドリアで受容されるかはまだ不明のままである。そこで、この問題をまず顕微測光法とアンペロメトリー法を用いて検討した。モルモット副腎髄質は、低酸素やプロトノアのCCCPに対してラット副腎髄質よりも大きなCa応答を示した。さらに、モルモットの単離副腎髄質細胞はCCCPやcomplex IVの抑制薬であるシアンに対して著明な分泌応答を示したが、ラット副腎髄質細胞はほとんど分泌応答を示さなかった。これらの結果は、モルモット副腎髄質細胞が低酸素ばかりでなく、ミトコンドリア抑制薬に対してもより感受性を持っていることを示している。そこで、酸化的燐酸化に関与している酵素の発現量が、モルモットとラットの副腎髄質において差があるかどうかをイムノプロット法により調べた。アクチンに対して相対的に表したcomplex IVの発現量は、モルモットとラットにおいて副腎髄質と副腎皮質の間で差がなかった。一方、モルモットの副腎髄質におけるcomplex V β サブユニットの相対的発現量は、副腎皮質や心臓に比べて有意に多かった。ラットではこれらの組織間でcomplex V β の発現量に差がなかった。これらの結果より、モルモット副腎髄質細胞がミトコンドリア機能抑制の影響を受けやすいのにはcomplex Vが多く発現していることが関与している可能性がある。

19. モルモット心室筋のATP感受性K電流に対するverrucotoxinの作用

王 建武¹, 矢沢和人¹, Hao Li-Ying¹, 尾上義夫², 亀山正樹¹ (¹鹿児島大院・医歯総合・神経筋情報生理, ²鹿児島大・水産・資源育成)

オニダルマオコゼは蛋白毒 (verrucotoxin; VTX) を持ち、この毒により呼吸困難、心筋障害または痙攣などの全身障害が起こることがある。VTXの作用機序の1つとしてATP感受性K電流の修飾を示唆する報告があるが、細密な解析はされていなかった。我々はVTXのATP感受性K電流に対する作用を明らかにすべく、モルモット単離心室筋を用いて、膜電位固定 (whole cell clamp法) の実験をおこなった。ATP感受性K電流はATPチャネル活性化薬であるpinacidil (30 μ M) で活性化させた。その後VTXを投与すると、用量依存的にATP感受性K電流を抑制し、そのIC₅₀は16.3 μ g/mlであった。またVTXの作用に電位依存性は認められなかった。PKA抑制薬であるH-

89 (0.5 μ M) 前投与下では、ATP感受性K電流に対するVTXの抑制率は影響を受けなかった。しかし非選択的PKC抑制薬であるstaurosporine (0.6 μ M) や選択的PKC抑制薬であるchelerythrine (10 μ M) 投与後では、VTXのATP感受性K電流に対する抑制率は減少した。以上のことより、VTXはATP感受性K電流を抑制し、その機序はPKCの活性化を介していることが示唆された。

20. Contribution of the Kir2.x subunits to the cardiac strong inward rectifier I_{K1} channel

Yan Ding-Hong, 顕原嗣尚, 石原圭子 (佐賀大学・医・生体構造機能学・器官細胞生理)

心筋に発現している強い内向き整流性を示す I_{K1} チャンネルはKir2.1, Kir2.2, Kir2.3サブユニットによって構成される4量体であると考えられているが、各サブユニットの寄与についてはまだよく分かっていない。RNAや蛋白レベルでの検討では動物種、細胞種(心房筋と心室筋)によって異なる報告がなされている。今回われわれは、mRNAレベルでモルモット心筋細胞に発現していると報告されているKir2.1, Kir2.2, Kir2.3サブユニットをマウスL細胞に発現させて全細胞型電流を記録し、モルモット心房筋および心室筋の I_{K1} と比較した。Kir2.3チャンネル電流の内向き電流の時間依存性活性化はKir2.1, Kir2.2チャンネル電流および心房筋や心室筋の I_{K1} に比べると著明に遅く、時定数は約10倍大きかった。またKir2.3チャンネル電流の振幅は細胞外pHの変化によって大きく変化した。Kir2.1, Kir2.2チャンネル電流および心房筋や心室筋の I_{K1} は変化しなかった。さらにKir2.1とKir2.3のcDNAを異なるモル比でトランスフェクションすることによってKir2.1とKir2.3サブユニットを共発現させると、pH変化に伴う電流振幅の変化率はKir2.3 cDNA量に応じて増加したことから、Kir2.1とKir2.3のheteromerがpH感受性を示さないという可能性は否定されると考えられた。これらの結果はモルモット心筋の I_{K1} チャンネルへのKir2.3サブユニットの寄与は非常に小さいことを示すと考えられた。

21. マウス心筋L型Ca電流の“chemical phosphatase”による修飾

塩谷孝夫 (佐賀大学医学部 生体構造機能学講座 器官・細胞生理学分野)

2, 3-butanedione monoxime (BDM) は、chemical phosphatase として基質非特異的に脱リン酸化反応をおこすと言われており、リン酸化反応を介した細胞内情報伝達系の一般的な阻害薬となる可能性がある。そこで、この点について検証するため、マウス単離心室筋細胞からL型

Ca電流 (I_{Ca}) を記録し、 β 受容体—PKAを介したCa電流の増強反応がBDMによって阻害されるかどうかを調べた。外液中に投与したBDMは、濃度依存的に I_{Ca} を抑制した ($K_{1/2} = 7.3$ mM, $n_H = 1.33$)。Isoproterenol (1 μ M) で増強した I_{Ca} にBDM (20 mM) を投与すると、 I_{Ca} は対照よりも有意に小さな振幅に抑制され、この抑制には弱い電位依存性が認められた。また、 I_{Ca} 増強のIsoproterenol濃度依存性 ($K_{1/2} = 35.0$ nM, $n_H = 1.65$) は10 mM BDM投与でも変化しなかった ($K_{1/2} = 30.3$ nM, $n_H = 1.49$)。さらに、20 mM BDMの細胞内投与は I_{Ca} の電流振幅に影響せず、Isoproterenolによる I_{Ca} の増強をやや減弱させたが有意差は認められなかった。これらの実験結果は、BDMが主にCaチャンネルのブロックによって I_{Ca} を抑制することを支持し、chemical phosphataseとしての作用による I_{Ca} 抑制には否定的であった。以上から、BDMはリン酸化反応を介した細胞内情報伝達系の一般的な阻害薬としては適当でないと結論した。

22. P2Y受容体刺激によるCFTR電流の活性化

山本信太郎, 顕原嗣尚 (佐賀大学 医学部 生体構造機能学 器官細胞生理)

細胞外ATP (ATP_o) により心筋CFTRクロライド (Cl^-) 電流が活性化されることが報告されている。今回我々は、ATP_oによる心筋CFTR Cl^- 電流の活性化機構を、マウス単離心室筋細胞の全細胞電流記録法により検討した。細胞内外 Cl^- 濃度の等しい条件下で、ATP_oは、リニアな電流電圧関係を持ち、PTX非感受性G蛋白に依存する電流を活性化した。その逆転電位は様々な Cl^- 濃度の平衡電位に一致した。活性化された電流に、時間依存性は認めなかった。 Cl^- チャンネル抑制剤に対しては、DIDSに非感受性だったが、glibenclamideには感受性を認めた。一方、細胞外UTPでも同様の電流を活性化したが、ADPとUDPの効果は部分的だった。GTPでは効果を認めなかった。さらに、suramin (非選択的プリン受容体拮抗剤) は電流を抑制したが、PPADS (P2Y₂低感受性プリン受容体拮抗剤) は無効だった。U-73122 (phospholipase C (PLC) 抑制剤) とBIM (protein kinase C (PKC) 抑制剤) は電流を抑制した。以上の結果から、ATP_oはP2Y₂受容体—PLC-PKC系を介してCFTR Cl^- 電流を活性化することが示唆された。

23. P19CL6細胞の心筋細胞分化はp38-MAPKを介するGATA4発現に依存する

鄭 明奇¹, 内納智子¹, 門前幸志郎², 小室一成³, 賀来俊彦¹, 小野克重¹ (¹大分大学 循環病態制御講座, ²東京

大学大学院 循環器内科,³千葉大学大学院 循環病態医科学)

マウス Embryonal Carcinoma 細胞由来P19CL6 (CL6) 細胞は dimethyl sulfoxide の刺激によって心筋細胞分化誘導を受け、自動拍動性を獲得する。Mitogen-activated protein kinase (MAPK) は心筋細胞分化、形態形成において重要な役割を果たしていることが知られている。P19CL6 細胞由来の分化心筋細胞における膜電流形成に関わる細胞内シグナル、とりわけ MAPK を介するイオンチャンネル発現の制御様式の解明を行う。P19CL6 細胞は分化誘導後に過分極誘発内向き電流 (I_h) と 2 種類の Ca チャンネル電流 (I_{CaL} , I_{CaT}) を発現し、89 bpm の自動拍動性を示した。分化誘導後に出現する自動拍動とペースメーカーイオンチャンネルは p38-MAPK の阻害によって発現が抑制され、細胞膜電位も未分化 CL6 細胞と同程度であった。更に、転写因子 GATA4 の発現も著明に抑制された。一方、古典的 (ERK1, 2) MAPK, ERK5 及び、JNK-MAPK の活性抑制で分化過程に影響が認められなかった。P19CL6 細胞の心筋細胞への分化には非古典的 MAPK (p38-MAPK) を介する GATA4 発現が関ることが示唆された。

24. Homeobox 遺伝子 Csx/Nkx-2.5 による心筋イオンチャンネル遺伝子の機能的発現調節

王 岩¹, 内納智子¹, 鄭 明奇¹, 門前幸志郎², 賀来俊彦¹, 小室一成³, 小野克重¹ (¹大分大学 循環病態制御講座, ²東京大学大学院 循環器内科, ³千葉大学大学院 循環病態医科学)

Homeobox 遺伝子 Csx/Nkx-2.5 は心臓の発生に重要な役割を果たす臓器特異性の高い転写因子である。心臓発生において中胚葉から心臓予定中胚葉、心臓予定中胚葉から心臓前駆細胞、さらに原始心室から左心室の形成に関わる非常に多くの過程で転写因子 Csx/Nkx-2.5 が作用することが知られている。Csx/Nkx-2.5 の変異は、心奇形や心機能異常を呈し、イオンチャンネルの発現制御への関わりが示唆される。本研究は細胞分裂・分化機能を残存しているラット新生獣心室筋細胞を用いて、Csx/Nkx-2.5 の下流に存在し転写調節を受けるイオンチャンネル遺伝子を特定する。新生獣ラット心室筋細胞に組み換えアデノウイルスを用いて Csx/Nkx-2.5 を過剰発現させ、その細胞膜電位の変化を観察した。Csx/Nkx-2.5 過剰発現自動拍動心筋細胞は対照細胞に比べ、拍動が亢進し (0.76/s 対照 vs 0.83/s Csx)、活動電位持続時間が延長し (225ms 対照-APD75 vs 280ms Csx-APD75)、活動電位の最大立ち上がり速度 (2.1V/s 対照 vs 2.7V/s Csx) が増大した。心臓特異的転写因子 Csx/Nkx-2.5 は心筋細胞 Ca チャンネルと K チャンネルの発現

制御に関わることが示唆された。

25. ラット脳弓下器ニューロンへの α -アドレナリン受容体を介する興奮作用

本田栄子, 小野堅太郎, 中村太志, 佐藤奈緒, 井上弘子, 稲永清敏 (九州歯科大学・生理学講座)

脳弓下器 (SFO) へのノルアドレナリン (NA) の注入は飲水の増加を引き起こし、出血は SFO 領域の NA の放出を増加させる。これは、NA が SFO に作用し体液量や循環系の調節を行っている可能性を示唆している。今回、我々はパッチクランプ法を用い、NA の SFO ニューロンに対する作用について調べた。電流固定法により、64% (14/22) のニューロンが脱分極応答、27% (6/22) が過分極応答を示した。また、 -70mV の電位固定により、63% (33/52) のニューロンが内向き電流を、27% (14/52) が外向き電流を生じその電流は濃度依存的に増加した。ランプ波刺激による分析では、NA による内向き電流発生時に 21 例中 14 例はコンダクタンスの変化を伴わなかった。 $\alpha 1$ 受容体アゴニストのフェニレフリン刺激でも同様にコンダクタンスの変化は観察されなかった。このフェニレフリンによる反応は $\alpha 1$ 受容体アンタゴニストのプラゾシンによってブロックされた。21 例中 7 例ではコンダクタンスの上昇を伴い、その逆転電位は約 -30mV であった。また、 $\alpha 2$ 受容体アゴニストのクロニジンによって抑制性シナプス後電流の頻度が減少した。これらの結果は、NA が $\alpha 1$ 受容体を介して SFO ニューロンを活性化し、その作用はシナプス前膜の $\alpha 2$ 受容体を介する GABA の放出の抑制によって増強されることを示唆している。

26. 単離青斑核ニューロンにおけるオレキシン誘起脱分極電位

村井恵良¹, 赤池 忠² (¹久留米大学医学部第一生理学講座, ²北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座)

青斑核 (LC) ニューロンはオレキシン (ORX) 様作動性ニューロンの入力を受けており、ORX 受容体-1 型及び-2 型を発現していることが報告されている。本研究では、単離した LC ニューロンに対する ORX-A 及び-B (ORX-A/B) の作用をホールセル・パッチクランプ法で検討した。電流固定下において、LC ニューロンは ORX-A (10^{-7}M) 及び-B (10^{-7}M) の投与で共に脱分極した。また、ORX-A/B の投与でコントロール時における自発性活動電位の発火頻度が上昇した。これらの脱分極及び発火頻度の上昇は ORX-A/B の投与終了と共に元のレベルまで回復した。ORX-A/B による膜電位の脱分極は TTX ($3 \times 10^{-7}\text{M}$)、CNQX (10^{-6}M) 及び AP5 (10^{-5}M) 投与下にも

生じた。電圧固定下において、細胞外液のNa⁺をcholineに置換すると、ORX-A/B投与で生じた内向き電流を有意に抑制し、またその逆転電位を過分極側にシフトした。更に、薬理的に分離したK⁺電流に対するORX-A/Bの作用を検討した結果、ORX-A/Bは持続性K⁺電流のみを抑制した。

以上の結果より、ORX-A/Bは単離したLCニューロンにおいて、非選択性カチオンコンダクタンスの上昇と持続性K⁺コンダクタンスを抑制することによって膜電位を脱分極し、その結果として活動電位の発火頻度を上昇させることが示された。

27. マウス甘味応答細胞における甘味受容・伝達機構の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, ニノ宮裕三 (九州大学大学院・歯学研究院・口腔機能解析学)

甘味の受容・情報伝達にはT1r3とgustducinが関与することが明らかにされている。しかし、T1r3の遺伝子KOマウスを用いた研究では、T1r3が関与しない甘味受容機構の存在も示唆されている。本研究では味細胞における甘味受容・情報伝達機構を調べるため、マウス甘味応答細胞のT1r3およびgustducinの発現パターンを調べた。実験ではマウス茸状乳頭味蕾を単離し、ルースパッチ法により味細胞の応答を記録した。各種味刺激(0.3M NaCl, 0.02M サッカリン, 0.01M HCl, 0.02M キニーネ, 0.3M MSG)に対する応答を記録後、細胞を回収し、multiplex RT-PCR法によりT1r3及びgustducinの遺伝子発現解析を行った。甘味応答細胞におけるT1r3とgustducinの発現パターンは多様で、T1r3とgustducinを共発現する細胞とT1r3あるいはgustducinのみを単独に発現する細胞がそれぞれ存在した。この結果は、マウスの甘味受容・情報伝達機構が複数存在する可能性を示唆する。

28. T1r3, gustducin, Trpm5ノックアウトマウスの鼓索神経全神経線維束応答による甘味受容・情報伝達経路の解析

安松啓子¹, 重村憲徳¹, 吉田竜介¹, Damak S.², Margolske R. F.², ニノ宮裕三¹ (九州大学大学院 歯学研究院 口腔常態制御学講座 口腔機能解析学分野, ²Dept. of Physiol. & Biophys., Mount Sinai Sch. Med.)

マウス茸状乳頭味蕾には、グルマリン感受性(GS)および非感受性(GI)の少なくとも2種の甘味受容機構が存在することが明らかになっている。しかし、それらの味細胞内の情報伝達経路はまだ不明である。そこで、甘味受容体T1r3, Gタンパク α サブユニットgustducin, 陽イオン

チャンネルTrpm5それぞれの遺伝子ノックアウト(KO)マウスについて、舌にグルマリンを塗布する前後で鼓索神経応答を記録した。その結果、3種類のKOマウスのsucrose, maltose, fructose, glucose, アミノ酸に対する応答は、野生型マウスと比べ大きく低下していた。T1r3 KOマウスでは残存するsucrose, D-Ala, Gly, L-Pro応答がグルマリンにより約50%まで抑制され、Trpm5 KOマウスでは、D-Ala, L-Ala, L-Pro応答が40~70%まで抑制されたが、gustducin KOマウスでは調べた甘味溶液において抑制は見られなかった。以上の結果から、T1r3, Trpm5 KOマウスはGS, GI甘味受容機構の両方をもち、gustducin KOマウスは前者を持たないこと、gustducinはGS甘味受容機構の情報伝達における鍵分子であることが示唆された。

29. fMRIによるヒト第一次味覚領野の同定

脇田真仁¹, 小川 尚¹, 長谷川佳代子¹, 小早川 達², 坂井信之³, 平井俊紀⁴, 山下康行⁴, 斉藤幸子² (熊本大学・院・知覚生理, ²産総研・脳神経情報, ³神戸松蔭短大・生活科学・生活心理, ⁴熊本大学・医・病院・中央放射線)

Kobayakawaら(1999)は、味刺激により誘発される最短潜時の磁場応答が、中心溝下端および頭頂弁蓋部と島皮質の移行部に記録できることから、これらの領域を第一次味覚領野と同定し、特に後者をヒトのareaGとした。しかし、これまでPETやfMRIを用いた研究では、この領域に味刺激による賦活は見出していない。後者の研究では、口腔を連続的に刺激する方法で、味に対する順応が起っていた可能性がある。今回我々はコンピュータ制御の味刺激装置を用いて、味刺激期間中に味刺激パルスを繰り返し舌先に与えて、順応の少ない味刺激によるfMRI計測を行った。MRスキャナーはMagnetom Vision (Siemens) 1.5Tを用い、EPIで撮像しSPM99で解析した。その結果、個人解析では被験者11人中9人でareaGに、5人でローランド弁蓋部もしくは中心溝下端に賦活がみられ(uncorrected, $p < 0.01$)、グループ解析においても両側のareaGに賦活を見出し(uncorrected, $p < 0.01$)、右側のareaGが全体で最も強い賦活を示した。

30. ニューロメーター刺激による末梢神経活性化機構の解析

古賀浩平, 古江秀昌, 吉村 恵 (九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

ニューロメーター(NM)はサイン波電気刺激を経皮的に加えて感覚神経の閾値を評価する検査装置であり、臨床

において末梢神経異常の診断やその機能回復の検査に用いられている。NMの5, 250, 2000 Hzの特定周波数を用いた刺激がC, A δ , A β 線維をそれぞれ選択的に機能評価できると考えられているが、その刺激選択性を細胞レベルで調べた研究は見当たらない。そこで、行動実験、急性単離した後根神経節細胞から細胞内記録を行い、NM刺激によってC, A δ , A β 線維がどのように活性化されるか解析した。行動実験では、後肢に加えた5, 250 Hz刺激のみならず、刺激強度を高くすると2000 Hz刺激によっても逃避行動が観察された。C, A δ , A β 線維を伝導速度から同定し、後根を特定周波数で刺激すると、C線維は5 Hzにのみ活動電位を発生した。A δ 線維は、250Hz刺激の発生頻度が5 Hz刺激より有意に高かった。2000 Hz刺激では強い刺激強度で活動電位を発生し、この刺激強度は2000 Hz刺激の逃避行動の閾値とほぼ一致した。一方、A β 線維はすべての刺激に反応し、2000 Hzの通常刺激強度ではC線維とA δ 線維を活性化できず、A β 線維のみを興奮させた。以上の結果およびin vivoパッチクランプ法を用いた痛覚伝達機序の解析結果から、NMは感覚線維を選択的に活性化できることが示唆された。

31. 脊髄痛覚伝達系に対するATPとアデノシンの相互作用

中塚映政, 藤田亜美, 芳力軍, 古賀亜希子, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

最近、ATPおよびアデノシンが脊髄後角において感覚情報を修飾することが明らかとなり、それぞれの痛覚伝達に対する作用機序が解明されてきている。しかしながら、ATPは生体内において速やかにアデノシンに代謝されることが知られており、脊髄におけるATPが如何にATP P2X受容体ならびにアデノシン受容体に作用して、痛覚情報を総合的に修飾するかは不明である。今回、脊髄スライス標本を用いて脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行い、脊髄後角におけるATPおよびアデノシンの相互作用を検討した。自発性グルタミン酸作動性興奮性シナプス後電流に対してATP (100 μ M) を灌流投与すると、その発生頻度は最初の短期間において増強し、その後引き続き比較的長期間に減弱するという二相性の変化を示した。代謝安定型のP2X受容体作動薬である α , β -methylene ATP (100 μ M) によって微小興奮性シナプス後電流の発生頻度は著明に増強し、一方、アデノシン (100 μ M) あるいはA $_1$ 受容体作動薬CPA (1 μ M) によって、微小興奮性シナプス後電流の発生頻度は逆に減弱した。以上の結果より、脊髄内痛覚伝達系におけるATPの作用は経時的な要素を有する多彩な影響を及ぼすものと示唆された。

32. ラット脊髄膠様質における自発性興奮性シナプス伝達のAM404による促進作用

岳海源, 藤田亜美, 川崎康彦, 古賀亜希子, 中塚映政, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学分野))

最近、アナンダマイド輸送体阻害剤であるAM404がクローンTRPV1受容体を活性化することが報告されている。このことを1次感覚ニューロンの中枢端に発現しているTRPV1受容体で検討する目的で、脊髄後角第II層(膠様質)で記録される自発性興奮シナプス後電流(sEPSC)に対するAM404 (30 μ M) の作用を調べた。実験は、成熟ラットから脊髄横断スライス標本を作製し、膠様質細胞にブラインド・パッチクランプ法を適用することにより行った。AM404は調べた細胞の約80%においてカプサイシンと同様にsEPSCの振幅を変えずに発生頻度を約70%だけ増加させた。この作用はTTX (0.5 μ M) により影響を受けなかったことよりニューロンの膜興奮性増加によるものではなかった。一方、TRPV1受容体阻害剤であるカプサイゼピン (10 μ M) 存在下ではAM404作用は見られなかった。同じ細胞で調べた時、AM404によるsEPSC発生頻度増加作用はカプサイシン (2 μ M) の作用よりもずっと小さかった。以上より、AM404は膠様質の興奮性神経終末に存在するTRPV1受容体を活性化してグルタミン酸放出を促進し、この作用効率はカプサイシンのものより小さいことが示唆される。

33. 中枢神経終末のK⁺チャネル

正代清光, 野中喜久, 前田 恵, 王 智明, 鄭 孝鎮, 赤池紀扶 (熊本保健科学大学・保健科学部・衛生技術学科・生理)

分子生物学的研究において、K⁺チャネルのサブタイプは約70種類と報告されているが、機能的分類では10種類以内で、その機能が解明されているのはその半数に満たない。哺乳類CNS系シナプス前神経終末部のK⁺チャネルについての研究は始まったばかりで、発達途上の短期間に発現するスプーン状巨大終末(例、聴覚系のCalyx of Held)に直接パッチ電極をあて、いくつかのK⁺チャネルの存在が明らかにされているに過ぎない。我々はCNSのほとんどを占める直径1 μ m以下の微小シナプス前神経終末にも存在するであろうK⁺チャネルを知るため、終末部からの伝達物質放出の頻度を指標として研究を行った。用いた標本は1週齢ラット脊髄背側交連核(SDCN)より機械的に単離したSDCNシナプス・ブートン標本である。薬理的にGluやGABAの受容体を抑制し、TTX存在下にグリシンの自発性シナプス後電流(mIPSC)を記録した。

このmIPSCはいくつかのKチャンネル阻害剤投与下とその頻度を増加した。即ち、これは阻害剤下の終末部の脱分極によるCa²⁺チャンネルを介するCa²⁺流入の増加に起因することが無Ca²⁺外液、Cd²⁺やニフェジピン作用から判明した。なお、用いたK⁺チャンネル阻害剤は選択性が乏しいので、これら薬剤の交叉投与などで以下のKチャンネルの存在が間接的に推定された。

$$K_A / K_V \geq K_{IR} > BK_{Ca} / IK_{Ca} > BK_{Ca}$$

34. 高親和性IgEレセプター発現に及ぼす抗アレルギー薬の影響

花城和彦¹、渡慶次賀博¹、中宗根敏幸²、中村真理子¹、小杉忠誠¹ (¹琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野、²琉球大学医学部高次機能医科学講座顔面口腔機能再建学分野)

【目的】抗アレルギー薬の中には、IgE産生抑制作用を有するものがある。抗アレルギー薬が、高親和性IgE受容体(FcεRI)の発現抑制作用を併せ持つとすると、アレルギー反応初期(induction phase)の強力な制御となると考えられる。そこで、IgE産生抑制作用を有する抗アレルギー薬(azelastine及びepinastine)を用いて、FcεRI発現に及ぼす影響を検討した。【方法】IgE標的細胞としてラット好塩基性白血球細胞(RBL-2H3細胞)を用いた。薬剤10⁻⁵Mの存在下で細胞を24時間培養した。FcεRIα mRNA発現量は、northern blot法を用いて測定した。また、抗FcεRIα鎖抗体による免疫沈降法と抗FcεRIγ鎖抗体によるwestern blot法を用いて、FcεRIの細胞内蛋白発現量を調べた。更に、薬剤及びrat IgEの存在下でRBL-2H3細胞を24時間培養した。細胞溶解液を作製後、抗IgE L鎖抗体による免疫沈降法と抗FcεRIγ鎖抗体によるwestern blot法を用いて、細胞膜上のFcεRI蛋白発現量を調べた。【結果】FcεRI蛋白の細胞膜上発現は、azelastine及びepinastineにより抑制された。しかしながら、FcεRIα mRNA発現量及びFcεRI細胞内蛋白発現量に対するazelastine及びepinastineの影響は認められなかった。【考察】azelastine及びepinastineのアレルギー反応の制御は、①IgE-FcεRI相互作用の抑制、②FcεRIの細胞膜上発現の抑制、③FcεRIγ鎖リン酸化の抑制を介する機序によるものと考えられた。

35. Intracellular iron regulates PAI-1 mRNA stability—implications of involvement of a nuclear protein

Radha, K.S., Sugiki, M., Harish Kumar, Omura, S. and Maruyama, M. (Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan)

We explored the effects of intracellular iron on the expression of PAI-1 and associated cell-surface plasmin activity in human lung fibroblasts. ELISA and Northern Analyses revealed a dose dependent increase in PAI-1 antigen levels in all the cell lines subjected to treatment with deferoxamine, an iron chelator. Co-treatment with ferric citrate quenched the effect of deferoxamine. Experiments with transcription- and translation inhibitors on TIG 3-20 cells demonstrated that intracellular iron modulated PAI-1 expression post-transcriptionally and required *de novo* protein synthesis. EMSA and UV-crosslinking assays revealed the presence of an 81kDa nuclear protein that interacted with the 3'-UTR of PAI-1 mRNA in an iron-sensitive manner. Finally we showed that the increased PAI-1 was functional in suppressing cell-surface plasmin activity, a process that can affect wound healing and tissue remodeling.

36. 慢性アルコール性肝臓障害、胃粘膜障害へのグリシンおよび乳酸菌投与の影響

石打智津、中原桂子、村上 昇(宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理)

【背景・目的】慢性アルコール性肝臓障害の原因の一つとして、腸内のグラム陰性細菌破壊によって生じるリポポリサッカライド(LPS)の増加と、それにより活性化したクッパー細胞から放出される各種サイトカインなどのメディエーターによる細胞障害作用が示唆されている。腸内細菌叢に影響を与える乳酸菌や、LPS結合タンパク質受容体に作用するグリシンの投与が、アルコール性肝臓障害、あるいは胃粘膜障害に及ぼす影響について調べた。

【結果及び考察】ラットに経腸チューブを介して35日または50日間高脂肪食とアルコールを投与し、同時に乳酸菌またはグリシンの投与を行った。慢性的アルコール投与による血液中のLPSの増加と空胞変性、壊死などの肝臓障害は、乳酸菌またはグリシンの投与によってある程度抑制された。また、慢性的アルコール投与によって胃から分泌されるホルモンであるグレリンの増加がみられたが、この上昇もまた、乳酸菌またはグリシン投与によってある程度抑制された。グリシンの投与では、胃粘膜傷害の抑制がみられた。

37. 虚血性神経細胞死に対するprotein kinase Aの関与

田中永一郎、東 英穂(久留米大学医学部生理学第1講座)

成熟雄性ラット海馬スライス標本を対象に、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すると、6分後に急峻脱分極電位が発生し、直ちに酸素・グルコースを再灌流しても5分後には膜電位は消失し、不可逆性膜障害が生じた。Protein kinase A (PKA) 阻害薬 (H-89; 1 μ M or Rp-cAMPS; 100 μ M), adenylyl cyclase (AC) 阻害薬 (SQ22536; 100 μ M), calmodulin (CaM) 阻害薬 (trifluoperazine; 100 μ M or W-7; 50 μ M), protein kinase C (PKC) 阻害薬 (GF109203X; 3 μ M), phospholipase C (PLC) 阻害薬 (U73122; 50 μ M) を前処置すると、急峻脱分極電位は発生したが、大部分の細胞において酸素・グルコース再灌流で膜電位は部分的または完全に元のレベルに回復した。しかしながら、calcium calmodulin ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) で活性化される酵素である CaM kinase II あるいは myosin light chain kinase の阻害薬 (KN-62; 10 μ M or ML-7 10 μ M) の前処置では、急峻脱分極電位発生後に有意な膜電位回復は見られなかった。以上の結果から、 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, AC を介する PKA 活性化が虚血による不可逆性膜障害に関与し、PLC を介する PKC 活性化もまた不可逆性膜障害に関与することが示唆された。

38. 細菌の電子伝達フラビン蛋白における特異な吸収スペクトル

佐藤恭介, 二科安三, 志賀 潔 (熊本大院・医学薬学研究所・分子生理)

嫌気性細菌 *Megasphaera elsdenii* から精製される電子伝達フラビン蛋白は補酵素 FAD を一つ結合しているが、FAD を添加することによりさらにもう一分子の FAD を結合する。後から結合した FAD は、普通の FAD とは異なり、非常に特異な吸収スペクトルを示す。グアニジンを用いて蛋白から外した FAD は、スペクトルにおいても HPLC においても普通の FAD と同じ性質を示した。よってこの特異な吸収スペクトルは、FAD の化学修飾によるものではなく、蛋白内における FAD 周囲の環境によるものと考えられる。一方、哺乳類の電子伝達フラビン蛋白は、FAD を一つしか持たず、さらに一分子の AMP を結合している。この蛋白から AMP を外したものは、中性では普通のフラビンの吸収スペクトルを示すが、酸性条件下では *Megasphaera elsdenii* の後から結合した FAD に見られたものに非常に類似した吸収スペクトルを示した。このことは、これら二種類の電子伝達フラビン蛋白間の構造の類似性を示す。

39. ブラウン運動と筋細胞の働き

緒方道彦 (九州大学健康科学センター)

筋内の myosin head (MH) はランダムに揺らぐ。筋フィラメントに平行で方向反対な MH の変位を素過程とする確率過程モデルで個々の事象が集約できる。ポアソン過程の PDF で過渡現象の Twitch 波形が表現できる。そのパラメーター λ と負荷の関係から $\beta (= \varepsilon/k_B T)$ の値が得られる。Exp ($-\beta$) は筋フィラメントの backward slip を抑え、Exp ($-\beta p$) が収縮エネルギーに相当する。p ($0 < p < 1$) は負荷最大時の筋長 L_m と ΔL の比である。骨格筋 (m.semitendinosus, frog, 20 $^{\circ}$ C) の場合、 $\beta = 2.352$; $\lambda = 57 \text{ Exp}(-\beta p) + 43$; $\varepsilon \approx 9.5 * 10^{-21} \text{ J}$, $F = 1.9 \text{ pN}$; $L_m = 5 \text{ nm}$; λ の次元は時間の逆数であり、負荷に対し駆動力 (190 ~ 92 pN/s) が変化している。筋の elastic tension は平衡現象、ランダム配置のガウス過程であり、弛緩時の内部エネルギーは最大である。筋張力は $P^3 \text{ Exp}(-\beta)$ で近似できるので Actomiosin の 3-D 格子構造が構造蛋白の主役として筋のエントロピー弾性に関与していることになる。

40. 家兎培養血管平滑筋細胞のミオシン重鎖アイソフォーム SMemb mRNA の stability に関する検討

島田誠二, 砂川昌範, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

【目的】家兎胸部大動脈由来培養血管平滑筋細胞 (VSM cells) の SMemb mRNA 発現量を、bound thrombin が増加させるのを既に報告している。この発現量上昇の機序については幾つかの可能性が考えられる。そこで先ず、本研究では VSM cells における SMemb mRNA の崩壊速度が bound thrombin 刺激により遅延するか否かを検討した。【方法】VSM cells を PBS, thrombin 及び bound thrombin で 48 時間刺激した後、アクチノマイシン D (1 μ M) で処理した。VSM cells から total RNA を 0, 3, 6 及び 24 時間後に抽出し、SMemb, SM1, PAI-1 及び GAPDH mRNA 量を RT-PCR で経時的に測定した。無刺激群及び各刺激群の mRNA 崩壊速度から、それぞれの半減期を算出し、mRNA の stability を評価した。【結果】bound thrombin 刺激による SMemb mRNA の半減期は 25.7 時間であった。これは無刺激群と比較して約 5.7 時間延長した。また GAPDH, PAI-1 及び SM1 mRNA の半減期は無刺激群との間に有意差はなかった。【考察】bound thrombin 刺激による VSM cells の SMemb mRNA 発現量上昇の機序に、SMemb mRNA 半減期の延長が関与しているのが示唆された。

41. type II糖尿病モデルOLETFラット由来培養血管内皮細胞の機能評価

砂川昌範, 島田誠二, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

II型糖尿病モデルOLETFラット由来培養血管内皮細胞を用いて, 血管内皮細胞のt-PA, u-PA, thrombomodulin (TM), PAI-1 mRNA 発現量をRT-PCR法で半定量し, 血管内皮細胞機能を評価した. 対照として正常LETOラット由来培養血管内皮細胞を用いた. OLETF由来内皮細胞では, LETOラットに比してt-PA mRNA 発現量が増加し, u-PA及びTM mRNA 発現量が減少した. さらに, 高濃度グルコース (23.6 mM) を含む培養液で6時間培養を行うと, LETO由来内皮細胞では, t-PA mRNA 発現量が増加し, u-PA mRNA 発現量が減少した. 一方, OLETF由来内皮細胞では, グルコース刺激によりt-PA, u-PA, TM及びPAI-1 mRNA 発現量が減少した. また, OLETF由来内皮細胞をフォスフォジエステラーゼ阻害薬で24時間暴露すると, u-PA mRNA 発現量が増加し, t-PA mRNA 発現量が減少した. II型糖尿病では, 血管内皮細胞における凝固・線溶因子の産生に変化が生じており, 高濃度のグルコース刺激は, u-PA及びTM産生を減少させ, 線溶及び抗凝固能を低下させる可能性が示唆された. フォスフォジエステラーゼ阻害薬は, II型糖尿病による凝固・線溶因子産生の変調を改善する可能性が示唆された.

42. 新規ペプチドAdrenomedullin 2の人工的血液脳関門への生理作用

陳 磊¹, 山下 博², 竹井祥郎³, 上田陽一¹ (産業医科大学第一生理学, ²九州栄養福祉大学, ³東京大学海洋研究所)

Adrenomedullin (AM) ファミリーとして最近同定されたAM2はAM同様に末梢性降圧作用を有する. 我々は, これまでにAMの血液脳関門 (BBB) における保護作用機序を明らかにしてきた. AM2のBBBへの生理作用についての報告はない. そこで, AMと同様にAM2の人工的BBBへの生理作用を検討した. 星状細胞と脳血管内皮細胞 (CECs) の共培養系にAM2 (10^{-6} または 10^{-7} M) を添加した後, CEC内外の電気抵抗が著明に増加することと H_2O_2 によるCECの傷害が著明に減少することが見られた. AM2は細胞膜近傍のF-actinを増やし, H_2O_2 によって生じる細胞間ギャップの形成とミトコンドリアの破裂を防いだ. MTTおよびミトコンドリアポテンシャルに敏感な色素であるJC-1を用いて調べたところ, CECsの活性を保つことと H_2O_2 によるミトコンドリアポテンシャルの減少を防ぐことが明らかになった. 以上の結果より, AM2

はAMと同様の機序で人工的BBBを強固にすることが, およびラットCECsに対し強力な抗酸化作用を有することが示唆された.

43. Mechanical Unloadingが不全心筋に与える効果

高瀬谷 徹¹, 石松 秀², 田山栄基¹, 赤須 崇², 青柳成明¹ (¹久留米大・医・外科, ²第2生理)

目的; 左心補助装置 (LVAD) は心移植までのbridgeとして使用される一方でそのunloadingの効果により心機能が回復するとされている. 今回我々はラット不全心を異所性心移植し不全心筋に対するunloadingの効果を検討した.

方法; Doxorubicinを腹腔内投与し心不全ラットを作成した. その不全心を健常ラットの腹部に異所性心移植を行い2週間のunloadingを行った (DU群). また移植をしなかった同週齢の不全心をD群とした. 各群の左室重量, $[Ca^{2+}]_i$, Ca^{2+} -regulatory protein (SR-ATPase: SERCA2a; RyR: Ryanodine receptor; PLB: phospholamban) を測定した.

結果; 左室重量はD群に対してDU群では低下していた. $[Ca^{2+}]_i$ は健常心に対してD群は有意に延長していたが, DU群で有意に改善していた ($P<0.05$). SERCA2aは健常心に対してD群で低下していたがDU群で有意に増加していた ($P<0.05$). RyR, PLBはunloadingにより変化しなかった.

結論; unloadingはSERCA2aの発現を回復させることで, 心筋内 Ca^{2+} 代謝を改善させている.

44. ペーシング刺激により誘発されたラット右心房摘出標本における実験不整脈の興奮伝播の光学的マッピング

酒井哲郎 (琉球大・医・形態機能医科学・生理学第二)

ラット右心房摘出展開標本にメロシアンin・ローダニン系膜電位感受性色素 (NK2761) と多量子フォトダイオードアレイを用いた光学的多部位同時測定法を適用し, 興奮波伝播パターンの光学的マッピングをおこなった. 標本にペーシング刺激 (0.5-1Hz) を与えることにより, 頻拍性興奮 (tachycardia-like excitation: TE) を誘発した. TEは自発性活動電位の直後に与えられた刺激パルスにより誘発された. 興奮波伝播の時間的・空間的伝播パターンの光学的マッピングの結果, 自発性活動電位は正常に伝播したが, その直後の刺激によって誘発された活動電位の伝播には興奮波の伝播しないblocked areaが発現し, その周囲を興奮波が周回するmacro-reentry性の興奮波回路パターンが見られた. 同一標本でもTEのeventによりreentryのパターンが異なるevent-to-event variationが見られ, 安定

した blocked area の周囲を興奮波が巡回するパターンその他、不安定な blocked area の発現する例も見られた。

45. 冷え症と加速度脈波との関連

大和孝子, 青峰正裕 (中村学園大学栄養科学部)

一般に冷え症とは、身体の末梢部位である四肢や腰部に強い冷感を覚え、日常生活において苦痛を感じている場合をいう。冷え症の発症機序に関しては、自律神経機能失調や遺伝的要因などが関係しているといわれているが、未だ明確には解明されていない。そこで本研究では末梢血液循環機能を測定することで、冷え症であるか否かを客観的に判断することができるのではないかと仮定し、指先の加速度脈波を測定し、“冷え”との関連を調べた。加速度脈波は、末梢血管の収縮・弛緩を皮膚表面から波形として電気的、機械的にとらえ、末梢血管への血流の血管抵抗や血流に対しての血管の反応性を波形パターンとしたものである。被験者は女子学生414名で、自己申告により冷えを訴える者を冷えの度合いにより3段階(弱・中・強)に分類し、加速度脈波の波形とスコアにより冷え症との関連性を正常者のそれと比較した。対象者のうち約半数(200名)が冷えを自覚しており、その内訳は弱冷え80.5%、中冷え15%、強冷え4.5%であった。加速度脈波の波形とスコアによる末梢血液循環機能の分類から、波形およびスコアともに評価が低いほど冷え症者の割合が多く、逆に波形およびスコアともに高いほど正常者の割合が多かったことから、加速度脈波の波形とスコアを用いることで冷え症の有無とその度合いをある程度推察することができると考えられた。

46. 内頸動脈狭窄率と動脈血の血小板凝集能および凝固線溶系因子の関連

高良 秀¹, 天願博敦¹, 原国 毅², 砂川昌範¹, 中村真理子¹, 兵頭明夫², 吉井興志彦², 小杉忠誠¹ (1 琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一, 2 高次機能医科学講座脳神経外科学)

【目的】循環血中の血小板凝集能・凝固線溶系因子の動態と内頸動脈狭窄率の程度との相関性を把握することは、治療法の選択や予後の管理に効果的と考えられる。そこで、動脈血中のそれらの因子と狭窄率との関連性を検討した。【方法】内頸動脈狭窄症の大腿動脈血33検体の血小板凝集能(ADP, アラキドン酸, Collagen, PAF), 凝固線溶系因子(Fibrinogen量, FDP量, AT-III・APL活性値)を測定した。この各種測定因子の測定値を狭窄率70%未満と70%以上に分割し、ロジスティック回帰分析により狭窄率に対するオッズ比を求めた。さらに、狭窄率70%以

上の群でステント留置術を施行し、ステント留置術前後での各種因子の動態を比較した。【結果】ロジスティック回帰分析では、ADP凝集の上昇、PAF凝集の減少、AT-III活性値の減少、アラキドン酸凝集の減少が、統計学的有意差はないが狭窄率の上昇に寄与する傾向がみられた。ステント留置術後のADP, PAF, アラキドン酸凝集は狭窄率70%未満の値へ近づいた。しかしながら、AT-III活性値はステント留置術後も減少したままの値であった。【考察】内頸動脈狭窄症の動脈血中のADP, PAF, アラキドン酸凝集, AT-III活性値の動態は、治療効果の判定や術後の再狭窄予防に有効な情報を提供する。特に、ステント治療後もAT-III活性値を上昇させる必要があるのが示唆された。

47. 脳動脈瘤および内頸動脈狭窄症の凝固線溶系因子および血小板凝集能の検討—静脈血と動脈血の比較—

天願博敦¹, 高良 秀¹, 原国 毅², 砂川昌範¹, 中村真理子¹, 兵頭明夫², 吉井興志彦², 小杉忠誠¹ (1 琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一, 2 高次機能医科学講座脳神経外科学)

【目的】脳動脈瘤および内頸動脈狭窄症においては、動脈内に発現している凝固系の変化を、静脈血で把握する事は困難であろうと予測した。動脈血と静脈血の凝固線溶系因子の動態の相関性を知る目的で、血小板凝集能、凝固線溶系因子の定性・定量を行い、統計的に比較検討した。【方法】琉球大学附属病院脳外科に入院し、外科的手術を施行した症例の肘静脈血、大腿動脈血の血小板凝集能(ADP, Collagen, アラキドン酸, PAF), AT-III, APL活性値, Fibrinogen量, FDP量を測定した。動脈血と静脈血の血小板・凝固線溶系因子の測定値の比を算出し、相関性の程度を検討した。【結果】各種因子測定値の静脈血と動脈血の間には統計学的に有意差はみられなかった。しかしながら、脳動脈瘤の動脈血のアラキドン酸凝集率は、静脈血のそれと比較して低下していた。一方、内頸動脈狭窄症は、静脈血の測定値に比較して動脈血のアラキドン酸凝集の低下, FDP・Fibrinogen量の上昇がみられた。【考察】脳動脈瘤, 内頸動脈狭窄症のいずれにおいても、血小板のアラキドン酸凝集は内皮細胞に発生するはずの応力の違いから、静脈血と動脈血の間に差が生じたと考えられる。また、内頸動脈狭窄症の凝固線溶系因子は静脈血との間に差が見られた。動脈内病変の症例では、動脈血の血小板凝集能、凝固線溶系因子の動態を把握するのが重要であると推察された。

48. 腸管におけるブドウ糖吸収実習への小型血糖測定器の応用

清末達人, 伊東由里子, 山下幸子, 天本理恵, 南里宏樹, 水上茂樹 (西南女学院大学 保健福祉学部 栄養学科)

糖尿病患者用の小型血糖測定器を, ラット小腸反転標本におけるブドウ糖吸収に関する学生実習に応用することの利点および問題点について紹介する. Glucose oxydase 法による小型血糖測定器(アークレイ社製グルテストエース)は, ブドウ糖の定量法である hexokinase/glucose 6-P dehydrogenase 法と比較すると, 100mg/dl よりも低濃度でより低値を, 100mg/dl よりも高濃度側でより高値を示す傾向があり, また, 測定値が温度の影響を受けるなどの問題点はあるが, 測定に必要なサンプル量 (0.6~2 μ l vs. >5 μ l), 測定に要する時間 (15~30秒 vs. 5分), 初期費用などの点で優れていた. 特に, サンプル量が少なくすむため, 粘膜側, 漿膜側それぞれのブドウ糖濃度の経時的な測定が可能であった. この方法を用いて, 粘膜側にブドウ糖あるいは麦芽糖を負荷した場合の糖輸送の測定結果と, SGLT1の阻害剤フロリジン (1mM) と α グルコシダーゼの阻害薬アカルボス (0.2, 1mM) の抑制作用について報告する.

49. 口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞形成と骨浸潤機構

多田剛之^{1,2}, 自見英治郎¹, 福島秀文¹, 鍛治屋 浩¹, 岡本富士雄¹, 大関 悟², 岡部幸司¹ (1福岡歯科大学・細胞分子生物学・細胞生理学, 2福岡歯科大学・口腔腫瘍学)

【目的】口腔扁平上皮癌 (OSCC) の顎骨浸潤には破骨細胞が関与するが, 破骨細胞の分化誘導因子である RANK リガンド (RANKL) とその抑制分子 OPG の発現バランスが重要である. 本研究では RANKL と OPG を介した OSCC による破骨細胞の形成機序について検討した.

【方法】①ヒト OSCC 細胞株 (BHY, HSC-2, Ca9-22 細胞) の RANKL, OPG の発現を検討した. ②マウス骨髄細胞 (BMC) と野生型または OPG 欠損マウス骨芽細胞 (POB) の共存培養にヒト OSCC 細胞を添加し, 破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色後, TRAP 陽性多核細胞 (3核以上) を数えた. ③ヒト OSCC 細胞と POB を共存培養し, ヒト (h)RANKL, hOPG, hGAPDH, マウス (m)RANKL, mOPG, mGAPDH の変化量を検討した.

【結果】①BHY 細胞のみが RANKL と OPG を発現していた. ②共存培養に BHY, HSC-2 細胞を添加すると, TRAP 陽性多核細胞が形成された. ③BHY, HSC-2 細胞を加えると, POB 単独の場合に比べ mOPG の発現量が低

下した. ④BMC と OPG 欠損マウスの POB の共存培養に BHY, HSC-2 細胞を添加しても, 破骨細胞形成は促進されなかった.

【考察】ヒト OSCC 細胞は骨芽細胞との接触を介して骨芽細胞の OPG 発現を抑制し, 破骨細胞形成を誘導することが示唆された.

50. PTHrP と IL-1 α は乳歯から永久歯への歯牙交換を調節する

福島秀文^{1,2}, 自見英治郎¹, 鍛治屋 浩¹, 岡本富士雄¹, 本川 渉², 岡部幸司¹ (1福岡歯大・細胞分子生物学・細胞生理, 2福岡歯大・成育小児歯科)

前回我々は, 乳歯の歯根膜組織 (PDL) における RANKL と OPG の発現バランスが, 破歯細胞による乳歯の生理的歯根吸収に重要であることを報告した. 今回, この RANKL/OPG 発現を調節する因子を明らかにするため, 後続永久歯の歯胚から分泌される PTHrP, IL-1 α , TGF β および EGF に着目し, これらの因子がどの様に乳歯の歯根膜組織の RANKL/OPG 発現や破歯細胞形成を調節するかを検討した. その結果, ①上記因子の中で, PTHrP と IL-1 α はヒト PDL 細胞とマウス骨髄細胞との共存培養において多数の TRAP 陽性細胞を形成した. ② PTHrP は PDL 細胞の RANKL 発現を誘導したが, OPG 発現には影響しなかった. 一方, IL-1 α は PDL 細胞の RANKL 発現を促進すると共に, OPG 発現を抑制した. ③ PTHrP による TRAP 陽性細胞の形成は, 部分的に PKC 阻害剤で抑制されたが, cAMP/PKA 阻害剤では抑制されなかった. ④ ERK 阻害剤と COX-2 阻害剤は, IL-1 α による RANKL 発現上昇と OPG 発現抑制を減弱すると共に, TRAP 陽性細胞の形成を抑制した. 永久歯の萌出中に歯胚から放出される因子のうち PTHrP と IL-1 α は各々独立したシグナル伝達経路を介して, 歯根膜組織の RANKL/OPG の発現を変化させることにより破歯細胞の形成を制御し, 乳歯の生理的歯根吸収を調節していることが示唆された.

51. 破骨細胞に発現する CIC 型 Cl⁻チャンネルとそれらの骨吸収への関与

岡本富士雄, 鍛治屋 浩, 自見英治郎, 岡部幸司 (福岡歯科大学・細胞分子生物学・細胞生理)

【目的】破骨細胞 (OC) は H⁺ を分泌して骨を吸収する. OC に発現する Cl⁻チャンネル (CIC) の一つである CIC-7 は, H⁺ 分泌を支える重要な機能分子とされている. しかし, CIC-7 以外の Cl⁻チャンネルが骨吸収に関与しているかどうかは不明である. 今回, OC に発現する CIC を検索し, そ

これらの骨吸収への関与について検討した。【方法】マウスOCに発現するCIC mRNAをRT-PCR法にて調べると共に、OCのCl⁻チャネル活性、細胞内pHとCl⁻濃度、骨吸収活性、細胞内酸性化に対するCl⁻チャネル阻害剤やCICアンチセンスの作用を調べた。【結果】吸収窩を形成しているOCは、非形成のOCより外向き整流性のCl⁻チャネルが有意に活性化されていた。Cl⁻チャネル阻害剤はCl⁻チャネル活性、OCからのH⁺とCl⁻の分泌、および、骨吸収活性を抑制した。OCにはCIC-7の他にもCIC-3、4、5、6のmRNAが確認された。骨吸収活性はCIC-7のみならずCIC-3のアンチセンスによっても抑制された。また、CIC-3アンチセンスはCl⁻チャネル活性には影響しなかったが、細胞内の酸性化を抑制した。【考察】in vitroの実験系では、OCによる骨吸収にはCIC-7と共にCIC-3も関与していることが明らかとなった。CIC-3は細胞内オルガネラの酸性化を促してH⁺分泌に寄与していると考えられた。

52. 神経幹細胞の増殖、分化における酸素濃度の影響

堀江信貴^{1,2}, 守屋孝洋¹, 北川直毅², 永田 泉², 篠原一之¹ (長崎大学院 医歯薬 神経機能,²長崎大学 脳神経外科)

自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞は低酸素にて活性化されることが報告されているが、低酸素の至適条件については解明されていない。我々は線条体由来の神経幹細胞を用い、その増殖能や分化能における酸素条件での相違についてin vitroにて検討した。胎生マウス胎仔マウス線条体から分離培養した神経幹細胞を播種し、EGFによる増殖に対する様々な酸素濃度(20, 4, 2, 0%)の影響をBrdUアッセイにて検討した。また1%FBSによる分化誘導を行い、蛍光免疫染色法にて分化能に対する影響を検討した。低酸素による培養は有意に増殖能を亢進させたが、0%酸素濃度は影響を与えなかった。分化においても低酸素にて神経への分化を促進したが、酸素濃度0%は影響を与えなかった。アストログリア細胞への分化においては差が見られなかった。線条体由来の神経幹細胞は至適酸素濃度下にて増殖、分化が亢進した。この酸素濃度はischemic penumbraでの酸素濃度に類似しており、この部位にて神経幹細胞がより活性化を受ける可能性が示唆された。

53. 脳の性分化に果たす新生仔期の神経幹細胞の役割

西谷正太, 守屋孝洋, 篠原一之(長崎大学大学院・医歯薬・神経機能学分野)

性行動パターンの性差をもたらす神経核の形態学的性差(性的二型核)における生後の神経幹細胞の役割について

検討した。雄性および雌性の新生仔ラット(1日齢)にBromodeoxyuridine(BrdU)を投与し、神経幹細胞の分裂・増殖部位であるSVZ、および性的二型核として知られるAVPv, SDN-POA, SCN, VMH, MePDについて神経幹細胞の分裂・増殖能における性差を蛍光免疫染色法によって調べた。また、同時に性的二型核の大きさについても調べた。その結果、SVZにおいては、BrdU陽性細胞数に性差は見られなかった。このことから、SVZにおける神経幹細胞の分裂・増殖能には性差がないことが示唆された。また、AVPv, SDN-POA, SCN, VMHにおいては、SDN-POA, SCNの神経核の大きさは雄の方が雌よりも有意に大きい(p>0.05)ことがわかったが、BrdU陽性細胞数に性差は見られなかった。一方、MePDでは神経核の大きさに性差は見られなかったが、BrdU陽性細胞数は雄の方が雌よりも有意に多い(p<0.05)ことがわかった。したがって、成体ラットのMePDの形態学的性差は、新生仔期における神経幹細胞の分裂・増殖能の性差によってもたらされている可能性が示唆された。

54. 妊娠ラットのグレリン(Ghrelin)の胎児成長に及ぼす影響(1)

馬場由紀子, 中原桂子, 村上 昇(宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理)

2001年にラットおよび人の胃から同定された新規ペプチド、グレリンには摂食促進作用、GH分泌作用を示す。今回、グレリンの能動免疫ラットを妊娠させ、胎児の成長に及ぼす母親のグレリンの影響、また、妊娠ラットへのグレリンの慢性投与の胎児成長への影響を検討した。その結果、妊娠後期から母親にグレリンを浸透圧ミニポンプで毎日持続投与すると、通常より体重の増加した新生児が誕生した。一方、逆にグレリンの能動免疫ラット(グレリン抗体を有する)から分娩された新生児体重は有意に減少した。これらのことから母親のグレリンには胎児の成長を促進する作用があることが推測された。次に、妊娠ラットや胎児の血中グレリン濃度、および母親のグレリンの胎児への移行の可能性などについて検討した。その結果、胎児血中および羊水中に高濃度のデスアシルグレリンが検出された。また、母親にグレリンを投与すると10分後には胎児血中に高濃度にグレリンが測定され、母親から容易に移行することが示された。グレリン受容体(GHSR)の抗体で胎児切片を蛍光免疫染色したところ、皮膚、骨、舌、小腸、他多くの組織が陽性に染まった。以上の結果、妊娠中の母親のグレリンは胎児に移行し、胎児のグレリン受容体を介して体重の増加に作用していると推測された。

55. 妊娠ラットのグレリン (Ghrelin) の胎児成長に及ぼす影響 (II)

中川まり, 中原桂子, 村上 昇 (宮崎大学農学部獣医学科・家畜生理)

先の演題で馬場らは, 妊娠期の母親のグレリンが胎児へ移行し, 胎児の成長に重要な役割を演じている可能性を示した. そこで, 本研究では, 胎児のグレリン受容体の分布や, 胎児培養細胞に対するグレリンの効果を検討した. 胎児14~19日齢から種々の組織を採取し, RT-PCRによってGHSR1aのmRNAの発現を調べた結果, 皮膚, 消化器系, 循環器系, 神経系の殆どに発現を認めた. 胎児と新生児での発現には差が認められた. 胎児切片のオートラジオグラフィにおいて¹²⁵I-グレリンの結合部位を調べたところ, 広範囲に結合が認められた. この結合は過剰のグレリンの添加で阻害されたが, この阻害はデスアシルグレリンの方が顕著であった.

胎児の皮膚を培養し, 培養液にグレリンを添加すると, ³H-チミジンあるいはBrdUの取り込みが増加した. この細胞増殖作用はデスアシルグレリンでも認められた.

以上のことから, ラット妊娠期の胎児にはアシルグレリンの受容体GHSR1a以外にデスアシルグレリンに親和性の高いサブタイプが存在すること, アシルグレリンおよびデスアシルグレリンは胎児の皮膚細胞の増殖作用を有することが判明した. 恐らく, 妊娠期の母親由来のグレリンは胎児血中や羊水へ移行し, 胎児の成長に直接作用していると推測される.

56. 肝臓のマイクロゾーム分画によって誘導される遺伝子変異原性

高木厚司 (九州大学大学院医学研究院統合生理)

各種の化学物質は, 生体内 (特に肝臓) で様々な代謝産物に変化し, その一部は強い遺伝子変異原性を持つ. 培養微生物を使って遺伝子変異原性を判定する従来の標準法 (Ames法) では, 肝臓のマイクロゾーム分画成分 (S9 mix, P450解毒酵素を含有) を培地に撒いて評価する方法が一般的となっている. 今回, 著者らにより開発された「DNA損傷指標を利用する天然及び人工化学物質の簡易生物学的評価法, 並びにそのための装置 (PCT/JP01/02095, 発明者 高木厚司, 出願者 (有) 環境技術研究所, (株) 産学連携九州)」により, 代表的な遺伝子変異原物質であるベンツピレンその他のdG→8OHdG酸化誘導性が, 肝臓のマイクロゾーム分画成分 (S9 mix, ラット・オス誘導肝S9, Phenobarbital-induced S-D rat, 日本チャールズ・リバー) の添加の有無により有意に変化する事が確認できた. 本評価法は, 遺伝子変異が発生する際に実際の遺伝子で最も普遍的に生起しているdG→8OHdG酸化誘導のみ着目し, この発生率をもって全体の遺伝子変異原リスクを推定するものであり, 原理や測定方法が簡便で, 且つ, 低コストで生体実験を模倣できることから, 各食材や環境媒体の生体暴露評価の代替法として利用できると考えている.