

第56回日本生理学会中国四国地方会

会 期：平成16年（2004年）11月6日（土）

場 所：香川大学研究交流棟

当番幹事：香川大学医学部形態・機能医学講座（細胞情報生理学）

参 加 者：88名

中国四国地方会は今まで金曜日に開催していたが、学部学生や大学院生など若手の参加を促進する目的で、本年度は土曜日に開催した。88名の全参加者中のうちの18名が学部学生であり、全23演題中の6演題が彼らによるものであった。一定の効果を挙げたと判断している。会場では常に活発な議論がなされていた。評議員会においては、本地方会の活性化のためのさまざまな意見交換が行われた。地方会の総意でも改革を進めていくとともに、当番幹事の判断で、良いと思われる施策は積極的に進めて行くことを確認した。

なお来年度の当番幹事は、鳥取大学医学部機能形態統御学講座の予定。

1. Thr1296リン酸化による神経型NO合成酵素の活性制御機構

宋 涛, 波多野直哉, 久米広大, 山口文徳, 徳田雅明, 渡邊泰男（香川大学・医学部・細胞情報生理）

我々はこれまで神経型NO合成酵素（nNOS）のSer741, Ser847がそれぞれカルモデュリンキナーゼI（CaM-KI）, CaM-KIIによりリン酸化され、活性が可逆的に阻害されることを報告してきた。今回は新たにThr1296リン酸化がnNOSの酵素活性調節に関わっていることを報告する。リン酸化擬体nNOS（Thr1296をAspに置換した変異型：Thr1296Asp）は野生型に比してNOS活性は低く、その低活性は酵素学的に補酵素の1つであるNADPHに対する親和性の低下（Km値が20倍）によるものであった。培養神経細胞での過剰発現系において脱リン酸化酵素阻害剤（オカダ酸）処置下でnNOSのThr1296リン酸化が観察され、同時にNOS活性は低下した。リン酸化を受けられないThr1296Ala変異体nNOS発現細胞ではこの低下は見られなかった。以上のことより、nNOSは細胞内でThr1296のリン酸化修飾を受け、NADPH結合が阻害されることによりその酵素活性を負に制御されていることが分かった。内皮型NOSにはnNOSのThr1296に相当する部位にセリン、スレオニン残基は無く、このリン酸化シグナルはnNOS特異的なものと考えられる。

2. 複数のキナーゼによる神経型NO合成酵素のリン酸化シグナル調節

久米広大, 宋 涛, 波多野直哉, 山口文徳, 徳田雅明, 渡邊泰男（香川大学・医学部・細胞情報生理）

神経型NO合成酵素（nNOS）は複数の部位のリン酸化

修飾を受けて、活性が制御されている。今回新たに同定したリン酸化アミノ酸、Ser1412を含め、我々がこれまでに同定したnNOSのリン酸化シグナル（Ser741, Ser847, Thr1296, Ser1412）をリン酸化部位認識特異抗体にて解析したので報告する。In vitroとnNOSを発現している下垂体腺腫培養細胞（GH3細胞）におけるアゴニスト刺激による解析において、Ser741はカルモデュリンキナーゼI（CaM-KI）, Ser847はCaM-KII, Akt, Thr1296はCaM-KII, Aキナーゼ, Cキナーゼ, Ser1412はCaM-KII, Aキナーゼ, Aktによってそれぞれリン酸化修飾を受けた。更に、Ser847リン酸化シグナルはTRH（thyrotropin-releasing hormone）とEGFシグナルの下流にあることが分かった。TRHシグナルはカルモデュリン阻害剤（Calmidazolium）でキャンセルされ、EGFシグナルはMEK阻害剤（PD98059）で抑制された。活性型MEK1導入培養細胞でSer847はリン酸化されていたが、MEKを含めそれ以下のシグナル分子（ERK, MAPKAP-K1）の直接の関与は無かった。以上のことより、nNOSの複数のリン酸化シグナルは複数のリン酸化酵素によって選択的に制御を受けており、Ser847リン酸化シグナルはMAPキナーゼシグナルによって細胞内で制御されている可能性がある。

3. ダール食塩感受性高血圧ラットにおけるNADPHオキシダーゼの発現に対する抗酸化剤投与の効果

張 玲, 藤井重元, 五十嵐淳介, 小坂博昭（香川大学医学部自律機能生理学）

近年の研究により活性酸素と高血圧との関連が示されてきたが、活性酸素が高血圧性臓器障害を促進する機序については不明な点が多い。そこで我々はダール食塩感受性ラ

ット (DSラット) に抗酸化剤 N-アセチルシステインを投与し、その効果について検討した。4週間高食塩食 (8% NaCl) を与えた DSラットでは、血圧の上昇、尿中蛋白質排泄量の増加とともに酸化ストレスのマーカーである 8-isoprostane、過酸化水素の尿中排泄量が増加した。腎臓皮質では、活性酸素産生酵素である NADPH オキシダーゼのサブユニット gp91phox、p47phox の mRNA および蛋白質レベルでの発現が増加し、NADPH オキシダーゼ活性も上昇していた。DSラットに N-アセチルシステインを投与すると、高食塩負荷による血圧の上昇、尿中蛋白質、8-isoprostane、過酸化水素排泄量の増加は抑制され、NADPH オキシダーゼの活性および発現量の増加も抑制された。さらに、N-アセチルシステイン投与は DS 高血圧ラットのプラズマ中トロンボキサン B₂ レベルを低下させ、高食塩負荷による腎動脈の収縮反応の亢進と弛緩反応の減弱とともに改善した。これらの結果は、酸化ストレスが DS 高血圧ラットにおける臓器障害の進展に関わっていることを示しており、N-アセチルシステインは NADPH オキシダーゼの発現増加を抑制し、活性酸素の産生を抑えることにより、腎臓および血管の障害を軽減しているものと考えられる。

4. 冠微小循環の階層性血管調節機能における NO と EDHF の関与

山本岳玄¹、廣田真規²、井内洋介³、梶谷昌史²、清岡崇彦²、森本太郎²、岩崎達雄²、森實祐基²、宮坂武寛²、毛利聡²、清水壽一郎²、梶谷文彦² (¹岡山大学医学部医学科、²岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環生理学、³大阪大学大学院機能診断科学)

背景：

微小循環ではその血管径に依存した血流調節機構が存在する。

目的：

冠微小循環系に対する、アセチルコリン (ACh) の血管拡張作用において、一酸化窒素 (NO) と内皮依存性過分極因子 (EDHF) の関与を生体内にて可視化し、血管径ごとに比較検討した。

方法：

Wistar Kyoto (WKY) ラット (12週齢) の右室自由壁冠動脈の血管径変化を CCD 生体顕微鏡で観察した。cyclooxygenase の抑制後、ACh 投与群 (n = 55)、NO 合成阻害剤 (L-NAME) の投与後に ACh を投与した群 (n = 48)、NO 合成阻害剤と EDHF 阻害剤 (TEA) の投与後に ACh を投与した群 (n = 42) に分け、それぞれ血管径ごとに血管拡張率を測定した。

結果：

細動脈 (< 100 μm) では ACh による NO と EDHF を介した血管拡張率は 10.8% であったが、NO 阻害時には 6.8%、NO と EDHF の両方を阻害した時には 1.0% へと低下した。血管径 100 ~ 200 μm の小動脈では ACh 投与時 6.0%、NO 阻害時 2.4%、NO 及び EDHF 阻害時は 0.7%、血管径 200 ~ 300 μm の小動脈では ACh 投与時 2.1% であったが、NO 阻害時には 0.1% 以下となり、さらに EDHF を阻害しても有意な変化はなかった。細静脈 (< 100 μm) では、ACh 投与時の拡張率は 4.7%、NO 阻害時 3.4%、NO と EDHF 阻害時 0.1% 以下となった。小静脈 (100 μm ~ 300 μm) では、ACh 投与による血管拡張は見られなかった。

結論：

冠微小循環調節機能への NO と EDHF の関与は、細動脈では EDHF 優位、血管径 100 ~ 200 μm の小動脈では NO 優位な血管拡張が見られるが、血管径 200 ~ 300 μm の小動脈では NO による血管拡張のみが観察された。一方、静脈系では細静脈 (< 100 μm) のみに EDHF 優位な血管拡張が見られた。以上より、血管拡張において、EDHF は細動脈 (< 100 μm) に対して、NO は小動脈 (> 100 μm) に対して優位な血管調節機能を担い、小静脈の調節は EDHF、NO ともに関与しない事等が示された。

5. Real-time Extracellular pH and pCO₂ Monitoring of Excised Rabbit Aorta with Microsensor System Based on Ion-sensitive Field Effect Transistor

Atsushi Fujita, Satoshi Mohri, Michihiro Nakamura, Noriko Goda, Juichiro Shimizu, Takehiro Miyasaka, and Fumihiko Kajiy (Department of Cardiovascular Physiology, Okayama University Graduate School Medicine and Dentistry)

Background : Cellular activities such as mitochondrial respiration produce metabolic products of acids or alkalines, e.g. CO₂, lactate, and bicarbonate. To maintain an appropriate intracellular environment, pH is regulated by several acid-extruding membrane mechanisms, Na⁺/H⁺ exchanger, Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, and Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter of endothelium. HCO₃⁻ plays important role in regulating the intracellular pH and therefore simultaneous monitoring of extracellular pH and pCO₂ of excised vessels leads to understand how these vessels work to keep homeostasis. However, no study has done because of the difficulty in the precise and real-time measurements of a small quantity of solution. Therefore, we developed pH

microsensor system based on ion-sensitive field effect transistor (ISFET) which can detect pH and pCO₂ changes in less than 1 microL solution and evaluated the metabolism in the immediate vicinity of endothelial cells of excised rabbit aorta.

Materials and Methods : The dimension of ISFET sensor was 0.45 mm width × 0.18 mm thickness × 5.5 mm length. Two sensors were placed at the center of excised rabbit aorta, one was for pH measurement and the other was covered with CO₂ permeable silicon tube for pCO₂ measurement. We used Tyrode solution buffered with sodium bicarbonate (D-glucose : 15 mM, NaCl : 140 mM, KCl : 5 mM, MgCl₂ : 0.9 mM, HEPES : 0.1 mM, pH 7.4) which was much more sensitive to pH change than blood. After continuous circulation of this solution, we stopped the solution and then monitored the time course of pH and pCO₂ changes for 10 minutes.

Results : pH and pCO₂ were changed monotonically and got saturated at 10 minutes. Changes of pCO₂ at 10 minutes were significantly larger than that of pH (-0.76 ± 0.10 and -0.93 ± 0.09 respectively, n=5, p<0.05).

Conclusion : We firstly succeeded in real-time and simultaneous pH and pCO₂ monitoring of excised rabbit aorta. Larger change in pCO₂ compared to pH suggested secretion of alkaline, which should be HCO₃⁻. Using chemical equilibrium of CO₂, lactate, and bicarbonate, we found that the amount of bicarbonate ion secretion was one-third of CO₂ production. This technique will be a powerful tool for evaluating metabolic state of excised tissues and/or cultured cells.

6. 血管平滑筋の sphingosylphosphorylcholine (SPC) 反応性に対するコレステロールおよび膜ラフトの関与の検討

岸 博子^{1,2}, 森景則保¹, 津本麗奈², 周 峰¹, 加治屋勝子¹, 小林 誠^{1,2} (¹ 山口大学医学部医学科 器官制御医学講座 分子細胞生理学, ² 山口大学大学院医学研究科 応用医工学系 デジタル情報制御医学講座 デジタル細胞制御学)

Rhoキナーゼ (ROK) を介した血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮は、血管の異常収縮である血管攣縮の病態生理に中心的役割を果たす。我々は、このROK経路の上流分子として sphingosylphosphorylcholine (SPC) を同定し、更にSPCはSrcファミリーチロシンキナーゼ (Src-TKs) の活性化を介して、ROKを活性化する事を見出し

てきた。一方、高コレステロール血症は、最も強力な血管病のリスクファクターである。そこで、今回我々は、SPCによる血管の異常収縮における、コレステロールおよびこれに富む膜ドメインであるラフトの役割について検討した。ヒトおよび高コレステロール食負荷ウサギの腸間膜動脈平滑筋を用いた収縮実験では、血中総コレステロール濃度とSPC反応性は正の相関を示し、高脂血症治療薬で血中総コレステロール濃度が低下すると血管平滑筋のSPC反応性も減少した。また、血管平滑筋をβ-cyclodextrin (β-cdx) で処理して血管組織中のコレステロールを選択的に除去すると、SPC反応性は消失した。培養血管平滑筋細胞において、SPCはSrc-TKsの1つであるfynおよびROKの細胞膜への移動を誘発した。膜ラフトの指標として局在蛋白であるカベオリン-1や膜ラフトを標識するコレラ毒素サブユニットB (CT-B) を用いて検討すると、fynおよびROKはSPC刺激により膜ラフトへ移動していると考えられた。更に、β-cdx処理により膜ラフトが破壊され、SPC刺激によるfynおよびROKの細胞膜への移動が消失した。以上より、血管平滑筋のSPC/Src-TKs/ROK系によるカルシウム非依存性収縮のシグナル伝達にコレステロールおよび膜ラフトが重要である事が示唆された。

7. 静的運動時にみられる毎分心拍出量の調節

塩 久, 中本智子, 村田 潤, 松川寛二 (広島大学大学院保健学研究科)

静的運動時の循環応答に関する過去の研究において、実際に毎分心拍出量 (CO) および心臓交感神経活動 (CSNA) を同時記録したという報告はない。よって今回の研究では、意識下ネコを用いて、CO, CSNA, 心拍数 (HR) および動脈血圧 (AP) を記録し、静的運動時の心拍出量応答ならびに交感神経性調節のしくみを調べた。COは運動初期からHRの増加に伴って増え、その後HRの低下がみられたものの、運動を通して高いレベルを維持した。一方、CSNAも運動を通して高い活動レベルを維持していた。これらの結果より、運動に必要なCOは、運動初期にはHRの増加によって、その後は心収縮力が増加し一回心拍出量が増すことで調節されていることが示唆された。また、CSNAの増加はそれらの応答に関与することが示唆された。さらに、ヒト静的運動時にみられるCO, HRおよびAPを記録し、動物実験のデータと比較検討した。

8. 内皮機能に対する運動の効果

麻原仁子¹, 佐藤和紀², 末松真由美², 武田知美², 辻岡克彦¹ (¹ 川崎医科大学・生理学, ² 川崎医療福祉大学・医

療情報学科)

本研究では、Dahl食塩感受性ラットに、動脈硬化リスクファクターである高血圧and/or高コレステロール血症を食餌により誘発させると同時に、慢性運動を負荷することにより、血管内皮機能にどのような効果があるか調べることを目的とした。

〈実験方法〉動物に各誘発食を8週間自由量与えた。同時に37℃温水にて、1時間/日、5日/週、8週間のswimming exerciseを負荷した。隔週で生理的状态を調べた後、8週目の大動脈一腎動脈分岐部における内皮細胞中のNO産生量とsuperoxide産生量をレーザー顕微鏡で観察した。

〈結果〉正常食群、高食塩食群ともに、運動負荷により体重の増加率に変化は無かったが、約10%軽かった。高食塩食群の血圧は、運動負荷2週目には正常食群と同様であったが、4週目には運動非負荷一高食塩食群と同様の高血圧を示した。正常食群、高食塩食群ともに、末梢組織の余分なコレステロールを取り込んで肝臓に回収する働きをもつため「善玉コレステロール」と言われるHDLは約15~20%上昇した。また、その増加は間接的に脂質代謝に影響を与えるトリグリセライドは約40~70%減少した。総コレステロール量及び総タンパク量に変化はなかった。

このように、運動負荷は、動物の生理的状态を、動脈硬化抑制の方向へ向ける効果があった。血管内皮細胞中のNO及びsuperoxide産生量について、動脈硬化好発部位と非好発部位で比較検討したので報告する。

9. 慢性犬を用いた胃噴門部弛緩能の評価法の確立と、5HT₄受容体刺激薬の胃噴門部弛緩能に対する影響の検討

古川直裕¹、角田紋子¹、島谷智彦³、畑野瑞恵¹、楠 裕明²、本多啓介²、田中俊昭²、春間 賢²、辻岡克彦¹ (¹川崎医科大学・生理学、²川崎医科大学・内科学(食道・胃腸科)、³広島大学病院・総合診療科)

これまで困難であった胃噴門部の弛緩機能の評価が、最近、ヒトにおいて、パロスタットを用いて試みられるようになった。しかし、薬物効果の検討などには欠かせない動物実験においては、胃噴門部弛緩能の評価はほとんど行われていない。今回、パロスタットを用いて覚醒下のイヌの胃噴門部弛緩能を評価し、それに対する5-HT₄受容体刺激薬mosaprideの影響について検討した。

ネブプタール麻酔下で、胃体上部に胃ろう管を、胃体中部と胃前庭部、および十二指腸にフォーストランスジュエサを取り付け、10日以上回復期間後、覚醒下にて実験を行った。胃ろう管より胃噴門部にポリ袋付きカテーテルを挿入し、パロスタットから定圧で空気を注入した。実験

では2mmHgずつの段階的加圧による胃噴門部の圧-容積関係を検討し、mosaprideとplacebo投与での比較を行った。さらに、基礎伸展圧+2mmHgでの定圧伸展中に投薬を行い、胃容量に対する急性の効果も検討した。同時に、胃体部と胃前庭部、および十二指腸の運動を描記した。

その結果、mosapride (2mg/kg)は、胃前庭部と十二指腸の運動を著明に亢進させ、胃体部の運動を軽度亢進させた。しかし、定圧条件下における胃噴門部容量に対しては急性効果を及ぼさず、胃噴門部における圧-容積関係も変化させなかった。このことは、mosaprideが胃排出を促進するものの、噴門部の弛緩能は温存することを示している。慢性イヌにおけるパロスタットを用いた研究は、薬物による消化管機能変化の評価法の一つとして有用であると思われる。

10. 呼吸様式及び胃内圧が嚥下反射と咽頭反射に及ぼす影響

氷見直之¹、井上綾子¹、芦田千春²、河合健介¹、古我知成²、辻岡克彦¹ (¹川崎医科大学・生理学、²川崎医療福祉大学・リハビリテーション学科)

上喉頭神経を求心性に刺激すると、嚥下反射(swallowing reflex)あるいは咽頭反射(gag reflex)が誘発される。この現象は、上喉頭神経が延髄弧束核の中継細胞を介して、嚥下中枢または咽頭反射中枢を賦活している可能性を示唆している。今回、嚥下反射と咽頭反射の切り替えにはどのような要因が関与するのか検討した。

実験は、9~12週令の除脳SDラットを用い、人工呼吸下で行った。胃底部より2個のバルーンを挿入し、胃の伸展に伴う胃内圧変動を記録した。上喉頭神経を求心性に20秒間の連続刺激(1~10V, 10~20Hz)し、嚥下反射及び咽頭反射を誘発した。顎舌骨筋、腹直筋、横隔膜より筋電図を記録し、各反射の指標とした。

胃の伸展により、嚥下反射の回数および筋活動量は抑制された。1回換気量もしくは呼吸数を減少させると、嚥下反射の回数は抑制され、咽頭反射が出現した。催吐剤であるアポモルフィン(0.1mg/kg)の投与直後、嚥下反射は促進され、その後抑制される傾向であった。

以上の結果より、(1)胃からの求心性活動の増加、(2)呼吸抑制による血中二酸化炭素濃度の上昇、(3)催吐剤投与による最後野の活動増加などの要因が、嚥下反射から咽頭反射への切り替えを促進させていることが示唆された。またこれらの結果は、ヒトにおける嚥下反射と呼吸様式の関係(芦田ら、2004)と一致するものであった。

11. ラットにおける排便時大腸運動の迷走神経による調節

栄 訓代, 妹尾亜矢子, 大西貴子, 福田博之 (川崎医療福祉大学 臨床栄養学科)

【目的】Tracerを用いた組織学的研究により, ラットでは, 迷走神経中の副交感神経が全大腸を支配し, 骨盤神経中のそれは大腸の遠位半分までを支配していると言われている. 除脳ラットの頸部迷走神経を遠心性に電気刺激すると下行結腸・直腸に収縮が惹起された. これらの結果は, ラットでは迷走神経中の副交感神経が, 排便時の大腸収縮に関与している可能性を示唆するので, それを検討し, 次の結果を得たので報告する.

【方法】実験は, クロラロース (60mg/kg, i.v.) とペンバルビタール (16mg/kg, i.v.) による麻酔下の中脳吻側で除脳したラット (280-350g) でおこなった. 下行結腸と直腸の収縮をバルーン法で記録した. 排便反射は記録バルーンによる伸展と肛門管の電気刺激により誘発した.

【結果】1) 肛門管の電気刺激や下行結腸の伸展刺激は, 下行結腸や直腸に排便収縮を惹起したが, 近側結腸の運動を抑制することが多かった. 2) 頸部迷走神経両側切断後には, 下行結腸の収縮が減弱した例があったが, 近側結腸には強収縮が惹起された. 3) 迷走神経と骨盤神経の個別刺激による収縮より, 強い収縮が両神経の同時刺激により, 惹起された.

【結論】これらの結果は, 排便時の大腸運動が, 迷走神経により抑制性および促進性調節を受けている可能性を示唆する.

12. 胎生期から若年期にわたる音楽刺激マウスが高次脳機能に及ぼす影響

近久幸子¹, 森島真幸², 佐野敦子¹, 北岡和義¹, 勢井宏義¹, 森田雄介¹ (1徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部, 統合生理学分野, 2徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部, 代謝栄養学分野)

音楽の高次脳機能への影響については, “モーツァルト効果”という名称が提唱されるほどよく議論されている. 我々は, 胎生期からの音楽刺激が成熟後の学習・記憶能を向上させるかどうかについて, マウスを用いて検討した.

実験動物にはStd: ddYマウス24匹を用い, 胎生期(妊娠14日目)より音楽およびホワイトノイズを聴かせる群, 何も聴かせないコントロール群の3群に分類した. マウス成熟後(生後61日目), それぞれの群についてcross-maze装置を用いた学習実験を8日間行った. その後脳を摘出し, 大脳皮質, 海馬, 脳幹, 小脳の4部位に分離し,

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 蛋白をELISA法によって定量した.

課題遂行時間については, 3群間に差は認められなかった. エラー回数については, 音楽群とコントロール群の間に有意差は認められなかったものの, ホワイトノイズ群は, 音楽群およびコントロール群に対して有意に高く, ホワイトノイズ刺激による学習・記憶能の低下が示された. BDNFは, 大脳皮質では音楽群がホワイトノイズ群より有意に低かったのに対し, 小脳では音楽群はホワイトノイズ群より有意に高かった. これらのことからマウスにおいても, 胎生期からの音刺激が, 学習機能に影響を及ぼすことが明らかになった. そのメカニズムについて, BDNFとの関連性も含め, 現在検討中である.

13. HSP70誘導剤geranylgeranylacetoneは断眠によるREM睡眠のリバウンドを抑制する

和田匡史¹³, 楠本健二², 勢井宏義¹, 北岡和義¹, 近久幸子¹, 漆原 良¹, 六反一仁², 森田雄介¹ (1徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野, 2徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ストレス制御医学分野, 3徳島文理大学)

睡眠を奪うこと(断眠)は, 脳内に様々な反応を引き起こし, その結果, 睡眠のリバウンド的増加を誘起する. Heat Shock Protein (HSP)の発現も, 断眠によって影響を受けることが報告されている. また, 加温によるHSPの発現増加は, 断眠に対する耐性を強化させることがハエを用いた実験で明らかになっている. そこで我々は, 断眠に対する睡眠・覚醒リズムおよび体温の反応性について, HSP70誘導剤であるgeranylgeranylacetone (GGA)の前投与による変化を, ラットを用いて観察した.

8-10週齢のWistar系雄性ラットをGGA投与群と対照群に分け, GGA投与群には5%アラビアゴムに混合したGGAを600mg/kg分, 対照群には同量の5%アラビアゴムを経口投与した. 脳波・筋電図・深部体温を連続的に記録しながら, 投与から2日をおいて6時間の断眠を施した. 断眠後1日間記録を継続した後, 脳を取り出しHSP70 mRNAの発現量をRT-PCR法により定量した.

両群とも, 断眠後に有意な睡眠増加を示した. REM睡眠の増加はGGA群において有意に抑制されていた. NREM睡眠の増加には群間に差がなかった. また, 断眠中の体温上昇がGGA群において有意に抑制されていた. HSP70 mRNAの発現は, 脳幹においてのみGGA群の方が有意に増加していた. GGA, あるいはHSP70はREM睡眠のリバウンド現象に関わっていることが示唆された.

14. 光学的膜電位長時間多部位連続記録システムの大脳皮質神経活動記録への適用

廣田秋彦¹, 伊藤眞一¹, 平川正人² (¹ 島根大学医学部神経・筋肉生理学, ² 島根大学総合理工学部情報工学)

我々は1020ヶ所の膜電位を, 膜電位感受性色素を用いて光学的に, 各部位それぞれ時間分解能1 msecで同時記録するシステムを開発してきた。膜電位感受性色素としてメロシアニン・ローダニン系の色素を用い, 光学系にハロゲン・タングステンランプを光源に用いた大型の光学顕微鏡を利用した吸光測光システムでは, 34行34列のマトリックスアレイ型フォトダイオードを受光器とした, 独自に開発したシステムにおいて, 光学シグナルをリアルタイムにハードディスクに書き込む方式を用いることで, 最大約1000秒間連続記録することに成功している。

このシステムをインタクたな脳の神経活動の記録に適用するためには, 膜電位感受性色素を螢光系の色素とし, 光学系を落射螢光系のものに変更する必要がある。光学測定では, ショット雑音を取り除くことが出来ないため, システムのSN比は実像の光強度の平方根に比例して改善することが知られている。一方, 膜電位の光学測定では, 膜電位変化由来のシグナルが背景光強度の0.1%程度と極めて小さいため, 光源の光強度の変化が, 測定シグナルの周波数帯域において, 0.01%オーダー以下であることが必要である。しかし, 光学系に大型顕微鏡の落射螢光を用い, ハロゲン・タングステンランプを光源としたシステムでは, 膜電位測定が可能なSN比を得るのに必要な明るさを得ることが出来なかった。また, キセノンランプなどのアーク放電を用いた光源は, 明るさの安定性の点で用いることができなかった。そこで, 我々は, 光学系にタンデムレンズを導入し, 励起光の光源に超高輝度発光ダイオードを用いるシステムに変更した。今回は, その新しい測定システムのラット大脳皮質の神経活動測定への適用例を示し, その問題点について考察する。

15. 放射状迷路学習における海馬セロトニン神経の役割とGABA神経による活動調節の検討

畠中智子^{1,2}, 宮久保浩子^{1,2}, 田中淳一² (¹ 兵庫教育大・連合大学院, ² 鳴門教育大・授業開発)

海馬のセロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)作動性神経が学習に関与していることが示唆されているが, その役割については一致した結論には至っていない。我々は, 8方向放射状迷路学習に伴う海馬CA1領域の5-HTとその代謝産物5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)量の変化について, マイクロダイアリシス法を用いて検討した。また, 海馬CA1領域には γ -aminobutyric acid (GABA)作

動性神経が存在することから, GABA作動性神経が5-HTの放出調節に関与しているか否かについても検討した。海馬CA1領域に透析プローブを植込んだFischer344雄性ラットに4方向迷路学習を課した。正選択率が2回連続して100%に達した翌日, 8方向迷路学習を1時間間隔で8試行を行い透析液を採取し, 電気化学検出器を備えたHPLCで分析した。第3試行と第7試行において, 正選択率と学習中の5-HIAA量の変化との間に負の有意な相関が認められたが, その他の試行では有意な相関はみられなかった。このことから, 5-HT神経は学習成立過程のある時期において特異的に作用することが推察された。GABA_Bアゴニストであるbaclofen(50 μ M)ではなく, GABA_Aアゴニストであるmuscimol(50 μ M)をプローブ内を灌流するリンゲル液に投与したところ, 投与後海馬CA1領域の5-HIAA量の減少が観察されたことから, GABA_A受容体機構が5-HT放出に関与することが示唆された。

16. 共培養下におけるラット副嗅球ニューロン-鋤鼻ニューロン間の機能的シナプス形成

村本和世, 黄光哲, 谷口陸男, 梶秀人(高知大学医学部統合生理学)

我々はこれまでに, フェロモンの情報処理に関わる鋤鼻神経系の役割を探究するために, ラットから切り出した副嗅球および鋤鼻器に由来するそれぞれのニューロンの共培養系を開発してきた。しかし, このような共培養条件下で副嗅球-鋤鼻ニューロン間に機能的なシナプスが形成されているかどうかについては未だ確認していなかった。共培養下でのシナプス形成を証明するため, 培養鋤鼻ニューロンへの電気刺激とカルシウムイメージング法を組み合わせることで検討を行った。共培養開始後21日目, 鋤鼻ニューロンを双極電極により電気刺激し, カルシウム螢光色素fluo-4を負荷した培養副嗅球ニューロンを観察すると, いくつかの副嗅球ニューロンで刺激によく一致して, 一過性の細胞内カルシウムの上昇が観察された。培養鋤鼻ニューロンからの軸索束の伸展は共培養7日目位から観察されるが, このようなカルシウムの変化は観察されなかった。刺激に対する応答は, グルタミン酸受容体拮抗薬である, CNQXの添加により可逆的に阻害されたが, APVの添加ではほとんど影響を受けなかった。一方, 培養副嗅球ニューロンでは, 複数のニューロンで同期した自発的カルシウム振動現象が観察されるが, この振動現象に対しては, CNQX, APVの両者とも抑制効果を示した。以上の結果から, 副嗅球-鋤鼻器の共培養下において, 機能的なグルタミン酸作動性のシナプスが共培養21日目頃までに形成され, 副嗅球ニューロン同士に形成されたシナプスとは薬理的性

質が異なっていることが示唆された。

17. Regulation of Calpain-dependent cleavages of Amphiphysin I

Yu-Mei Wu, Kazuhito Tomizawa, Fan-Yan Wei, Masayuki Matsushita, Yun-Fei Lu, Hideki Matsui (Department of physiology, Graduate school of Medicine and Dentistry, Okayama University, Okayama, Japan)

Amphiphysin I, a member of the BAR (Bin-Amphiphysin-Rvsp) protein super family, plays a key role in clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. Amphiphysin I mediates invagination and fission of synaptic vesicles in cooperation with Dynamin. We have shown that the function of Amphiphysin I is regulated by Cdk5 and calcineurin-dependent phosphorylation and dephosphorylation. Cdk5-dependent phosphorylation of the protein inhibits the association with the binding proteins such as β -adaptin. In the present study, we found that Amphiphysin I was cleaved to three fragments by treatment with high KCl (80 mM) in the mouse hippocampus slices. The cleavages were inhibited by treatment with ALLM, a potent calpain inhibitor. The high K⁺ stimulation also induced the cleavage of α -spectrin, a physiological substrate of calpain. Treatment with FK506, a potent calcineurin inhibitor, increased the extent of the KCl-induced cleavages of Amphiphysin I in the hippocampal slices. In contrast, treatment with roscovitine, a Cdk5 inhibitor, inhibited the cleavages. These results suggest that Amphiphysin I may be a substrate of calpain in presynaptic terminals and the cleavages may be regulated by the phosphorylation states.

18. Acinus 欠損マウスの解析

青戸 守¹, 前田信治¹, 辻本賀英² (¹愛媛大学・医学部・器官生理学, ²大阪大学大学院・医学系研究科・遺伝子学, CREST and SORST of JST)

要旨: Acinusは, 我々が*in vitro* アポトーシス系を用いることにより, caspase-3により活性化され, アポトーシス様のクロマチン凝集を引き起こす因子として単離したものである。本研究では, アポトーシスにおける Acinus の役割および哺乳動物の発生と成体における Acinus の機能を明らかにするために, Cre/loxP系を用いた conditional gene targetingを行った。Acinusのクロマチン凝集活性に重要な配列をコードするエクソンを含んだ領域を loxP 配列で挟む形で変異 Acinus アレルを持つ conditional

miceを樹立し, 更にCAG-Creマウスを交配することにより Acinus +/-マウス系統を得た。Acinus +/-マウスの交配の結果, Acinus -/-マウスは胎生致死であり, E7.5, E9.5, E10.5における Acinus -/-マウスの割合はそれぞれ34%, 26%, 15%であった。また, E11.5以後では生存していなかった。このことから, Acinusが哺乳動物の発生において重要な役割を果たしていることが示された。T細胞特異的ノックアウトマウスの結果も併せて報告する。

19. ラット脊髄損傷モデルにおけるマイクログリア, マクロファージの時間的, 部位的, 形態的な発現の解析

板野俊文¹, Wu Di², 宮本 修¹, 渋谷 整², 福田真衣子³ (香川大学医学部 ¹脳神経生物学, ²整形外科, ³形成外科)

脊髄に荷重を短時間くわえることで下半身に麻痺を誘導する損傷モデルはヒト脊髄損傷モデルとしてよく知られている。このモデルを用いる利点は荷重と圧迫時間の長短により不完全, または完全麻痺モデルを作成できることにある。不完全モデルでは運動機能の回復がみられることより, 神経系の修復モデルとしても有用である。我々は神経系幹細胞の再生を中心に研究を行っているが, 今回はマイクログリアおよびマクロファージ系の活性化を解析したので報告する。

SDラットの脊髄を露出し胸髄11-12に30g10分の荷重をかける。その後縫合し, 1, 4, 8, 12週に還流固定を行い, 損傷部位より5mm頭側部の20 μ mの切片を作成し, 免疫組織染色を行った。マクロファージとマイクログリアのマーカーとしてはED1, Iba1を用いた。

ED1抗体の染色は無処置のコントロール群では白質が弱く染色されるが, 損傷4週ごろから, 損傷部位周辺の後索, 腹側白質部にED1陽性の円形の細胞が観察された。この細胞は細胞質に顆粒を含んでおり, マクロファージと考えられる。この染色は8週まで続くが12週では減少していた。一方, Iba1抗体の染色はコントロール群では白質および灰白質が染色され, 静止型のマイクログリアと考えられる。損傷4週ごろから, 染色性は高まるが, ED1ほど強い染色性ではなく, 損傷部位周辺の後索, 腹側白質部にIba1陽性の細胞が観察された。この細胞は細胞質に顆粒を含んでおらず, 活性型マクロファージではないと考えられる。また二重染色のデータからはほとんどが重なっていないことがより, 別の細胞種を染色していると考えられた。

脊髄内におけるマクロファージとマイクログリアに関してはその起源, 活性化様式, 等が同一なものかどうかなど

不明な部分が多いが、本実験系はこれらの疑問を解決するための手段として有用であると考えられた。

20. ラット脊髄圧迫損傷モデルを用いた、神経の再生および修復に関する研究

福田真衣子¹, Wu Di², 渋谷 整², 宮本 修³, 板野俊文³ (香川大学医学部 ¹形成外科, ²整形外科, ³脳神経生物学)

神経の再生と修復のモデルとして、動物の脊椎損傷が用いられる。我々は中枢神経系における障害と神経系幹細胞による再生および修復機構を明らかにするため、ラットの脊髄損傷モデルを用いて、免疫染色による解析を行った。

ラットの脊髄に短時間の圧迫を加えることで脊髄損傷をつくり、神経の障害と再生のモデルとした。脊髄損傷24時間、1週間、4週間、8週間、12週間後とコントロールのラットの脊髄を取り出し、神経系幹細胞のマーカーである中間径フィラメントタンパク質であるネスチン、放射線グリアのマーカー蛋白質である3CB2、アストロサイトのマーカー蛋白質であるGFAP、オリゴデンドロサイトのプロジェクター細胞のマーカータンパク質としてNG2をプローブとして解析を行った。

障害の24時間後より再生するのはアストロサイト系の細胞であり、続いてオリゴデンドロサイトが再生し、神経細胞の再生はグリア細胞の再生が終了した後に始まることが判明した。一方、中枢神経障害後に比較的早い時間より再生するのは神経系幹細胞であり、この細胞はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、神経細胞へ分化すると考えられる。この実験により、ネスチンは障害24時間後では出血や壊死巣の周囲に発現し、障害1週間後より軟膜表面を基点として白質上に進展する放射状グリア上に、障害4週間後からは中心管周囲の灰白質優位に発現することが判明した。また放射状グリアはGFAPにも陽性であることから、アストロサイトとも共存することがあきらかとなった。以上より神経系幹細胞の分化の時間的な経過を明らかにする。

21. マイクログリア由来多能性前駆細胞の性質

横山彰子, 高橋寿明, 鈴木俊二, 今井嘉紀, 田中潤也 (愛媛大学医学部 分子細胞生命科学講座, 分子細胞生理学分野)

脳の主要なグリアの一種であるマイクログリアは、中胚葉起源であるとの意見が強いが、なお不明な点が少なくない。我々は、ラット一次培養マイクログリアを脱分化させ、出現する細胞の性質を検討することで、その発生学的起源に迫ることを考えた。マイクログリアを10% FCSを含む

培養液中で維持した後、70%血清を含む培養液で培養すると、Id 遺伝子産物を強く発現する未分化細胞 (プロマイクログリオプラスト, ProMGB) へと変化する。ProMGBの多くはCD56 (NCAM) を発現し、凝集塊を形成する一部の細胞はアストロサイトのマーカータンパク質であるGFAPを発現してくる。この凝集塊を無血清培養液に移すと、しばしば速やかに神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトに分化転換する。これらの結果はマイクログリアの少なくとも一部が神経外胚葉由来細胞である可能性を示唆しているが、中胚葉系細胞の分化転換である可能性も否定できず、現在詳細な検討を続けている。

22. ラット脳に存在する未分化細胞

田中潤也, 横山彰子, 坂本愛子, 高橋寿明, 鈴木俊二, 今井嘉紀 (愛媛大学医学部 分子細胞生命科学講座, 分子細胞生理学分野)

脳実質の主要構成細胞として一般的には神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、マイクログリアが挙げられている。しかし、実際にはそれらのいずれにも分類できない細胞が脳には多数存在する。今回我々は、ガングリオシドGD3, A2B5やネスチン, NG2コンドロイチン硫酸プロテオグリカンなど、神経系の未分化前駆細胞に発現するとされる分子群に対する抗体を用いて、ラット脳切片や一次培養系を対象に免疫組織化学的検討を行った。GFAPなどの分化細胞マーカーを発現しないNG2陽性細胞は、灰白質、白質を問わず広汎に多数分布しており、ラット脳実質を構成する主たる細胞の一つと考えられた。一方、神経幹細胞と思われるネスチン陽性細胞はガングリオシドGD3を発現し、脳室周囲など限局された部位に少数存在するのみであった。培養系では、NG2陽性細胞の大部分はオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーとされるA2B5抗原を発現していたが、ごく一部は、マイクログリアマーカーも発現しており、この稀な細胞群が多能性未分化細胞としてのマイクログリア細胞集団を構成している可能性がある。

23. The role of cell cycle regulated proteins (Skp2, p27kip1, p19ink4d, PTEN) during development of auditory system

Youyi Dong¹ Li Sui¹, Fuminori Yamaguchi¹, Yasuo Watanabe¹, Naoya Hatano¹, Tsuyoshi Endo², Takayuki Nakagawa², Juichi Ito², Masaaki Tokuda¹ (¹Department of Cell Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, ²Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Kyoto University School of Medicine)

The cell cycle is strictly regulated during development of organ of Corti to produce the correct number of sensory hair cells and supporting cells which are required for inner ear hearing function. Recent studies suggested that p27kip1 and p19ink4d, the cell cycle inhibitors, may play an important role in arresting the cell cycle of the sensory progenitor cells during development of auditory system. The F-box protein, Skp2 can positively regulate the G1-S transition by controlling the stability of several G1 regulators including p27kip1. PTEN, another tumor suppressor, can regulate the ubiquitin-dependent degradation of p27kip1 through the ubiquitin E3 ligase Skp2. Therefore, we set our aim to investigate the possible role of cell cycle regulated proteins, Skp2, p27kip1, p19ink4d and PTEN, during development of auditory system in

mice by using immunofluorescence, Western blot and RT-PCR techniques. The results showed that expression of Skp2 in auditory epithelia and neurons occurs at an early stage of development. During differentiation processes, the onset of p27kip1, p19ink4d expression was observed together with the down-regulation of Skp2 expression in auditory epithelia. PTEN begins to be expressed in the hair cells from inner to outer and from basal to apical according to a spatial-temporal gradient which is closely associated with Myosin VIIa expression (the hair cell differentiation marker). These findings suggest that cell cycle regulated proteins, Skp2, p27kip1, p19ink4d and PTEN may play an important role in regulating the cell proliferation and differentiation during development of auditory system.