

第52回中部日本生理学会

日	時：平成17年9月29日（木）	10：30～12：30	口頭発表
		13：30～14：30	ポスター発表
		14：30～17：30	口頭発表
		17：30～18：30	総会
		18：30～	懇親会
30日（金）	9：00～12：15		口頭発表
		13：30～	テニス大会

会 場：名古屋大学IB電子情報館（大講義室及びプレゼンテーションスペース）

当番幹事：名古屋大学環境医学研究所視覚神経科学分野，神経性調節分野

参加者数：134名（うち学生・大学院生が45名）

演 題 数：50題

「地方会はできるだけ若手の口頭発表の機会としてほしい」という生理学会常任幹事会の方針にそって本会も口頭発表を主体とする方針であったが，演題数が50題と多く，1日半の日程で1会場ではどうしても収容することができなかった。そこで，有職者はポスター発表に，大学院生や博士研究員は口頭発表にすることを，抄録締切り後に当番幹事からお願いし，快く受入れてもらった。ポスターに19題を移動したことにより，発表10分+討論5分という時間を確保することができた。非常に分野が異なる演題であるにもかかわらず，すべての座長（助教授クラス）が熱心に討論を司会してくれたため，大変有意義な討論ができた。ポスター発表の会場は大変ゆったりとしていて隣の討論に邪魔されずポスターを見ることができた点はよかったが，発表時間は昼食時間も含めて2時間とやや短かったことが残念であった。

総会は第1日目の午後5時半から同じ講義室で開催された。約50名の出席が得られた。5名の新任教授が紹介され，本大会の運営についての報告があった。また第53回大会の当番幹事校（山梨大学総合研究部）から挨拶があった。また，第54回大会当番幹事（三重大学医学部生理学教室）からは近畿地方会との合同開催について提案があり，承認された。次に各種委員会の報告が行われた。今回，ポスターボードに余裕があったので男女共同参画推進委員会は活動報告をポスターでも行った。活動報告にポスターを活用するのも委員会活動を身近なものにするのに役立つのではないかと考える。

1. 機械刺激によるATP放出の可視化解析

○古家喜四夫¹，秋田久美¹，志内伸光²，曾我部正博^{1,2}
 (¹科学技術振興機構・SORST・細胞力覚，²名大大学院・医・細胞生物物理)

ATPはパラクライン，オートクラインの媒体として様々な細胞，組織において重要な働きをしている。特に機械刺激応答に関連した生理機能に深く関わっていることが明らかとなってきた。私達は乳腺上皮細胞の機械応答が乳汁分泌の調整に関わっていること，小腸の絨毛上皮下の線維芽細胞が腸の機械受容に関わっていることなどを明らかにしてきた。このようなATP情報伝達系を解明するために，放出されたATPのイメージングが不可欠と考え，ATPを高速，高分解能で画像化できる顕微鏡システム開

発した。これはATPのLuciferin-Luciferase反応による発光を高感度で画像化するシステムであり，さらに赤外光を導入することにより発光とノマルスキー像との同時観測を可能にした。これを用い培養乳腺上皮細胞および小腸絨毛上皮下線維芽細胞からの，(1)タッチ刺激，(2)ストレッチ刺激，(3)Ca²⁺-free溶液置換によるATP放出を観測した。(2)及び(3)はどちらも細胞コロニー中の限られた数の細胞が大きな反応を示し，用量の増大に伴い反応細胞の数が増加した。(3)のATP放出は(2)に較べ時間経過が10倍以上遅く，放出機序の違いを示唆した。

2. 細胞外Na⁺除去によるアポトーシスの誘導とそのメカニズム

○温井美帆, 清水貴浩, 岡田泰伸 (総研大, 生理研機能協同研究部門)

一般に, アポトーシスは持続的な細胞縮小化を伴うが, 最近, 細胞外Na⁺濃度が低いと抗Fas抗体刺激で細胞膨張を伴うアポトーシスがJurkat細胞で生じると報告された (Bortner and Cidlowski, 2003, *JBC*). また, 細胞外Na⁺除去によってラット心筋細胞ではH₂O₂によるアポトーシスが抑制されるため, アポトーシスには細胞内へのNa⁺流入が必要であるという報告 (Yang et al., 2004, *FASEB J.*) もある. そこで我々はHeLa細胞を用いてアポトーシスにおけるNa⁺の役割を明らかにしようと試みた. その結果, Na⁺-free溶液中でのインキュベーションで, アポトーシス刺激を加えることなく細胞生存率低下, カスパゼ活性化, 細胞容積減少が生じた. この容積減少は, NKCCの阻害剤であるbumetanideによって抑制された. Na⁺濃度勾配に依存してイオン輸送するNKCCが細胞外Na⁺除去によって細胞外へのイオン流出をもたらした細胞縮小化が生じたと考えられる. さらにbumetanideは細胞生存率低下とカスパゼ活性化も抑制した. 以上の結果から, HeLa細胞において細胞外Na⁺欠如はNKCCを介した細胞縮小化をもたらしてアポトーシスを誘導することが示唆された.

3. シナプス伝達可視化を目指した新規蛍光性グルタミン酸可視化プローブの開発

○並木繁行, 坂本寛和, 飯沼 将, 廣瀬謙造 (名古屋大院・医・細胞生理)

グルタミン酸は中枢神経系の興奮性のシナプス伝達を担う非常に重要な分子であるが, その動態の時空間的解析は未だ不十分である. 本研究ではシナプス伝達におけるグルタミン酸動態を時空間に優れた解像度を持って解析を行う為に必要な蛍光性のグルタミン酸可視化プローブの開発を行った.

選択的グルタミン酸センサーとしてグルタミン酸受容体のGluR2サブユニットのグルタミン酸結合領域 (GluBD) を採用した. GluBDへのグルタミン酸結合に伴い, 環境変化が生じやすいと考えられる箇所のアミノ酸残基をシステインに置換し, チオール基特異的に反応する置換基を有する蛍光色素を結合させた. グルタミン酸結合に際して生じる色素近傍の環境変化を蛍光特性変化として検出することを狙い, 60種のシステイン導入変異体と20種の蛍光色素についてのコンジュゲートを作製・評価を行った. その結果, 403番のセリンと置換したシステインにOregon green488をコンジュゲートしたもの (403-OG) が有望な

結果を示した. 403-OGを培養海馬神経細胞の細胞膜上に固定化し, フィールド電気刺激を行ったところ活動電位の発生に伴い放出されたグルタミン酸の放出を蛍光イメージングすることができた.

4. 膜電位感受性酵素Ci-VSPにおける, 酵素活性の膜電位による制御機構: ドメイン間リンカー領域の役割

○村田喜理, 佐々木真理, 岡村康司 (自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター・神経分化研究室)

我々が, 尾索動物ホヤ (*Ciona intestinalis*) のゲノムから発見した, Ci-VSP (Ciona Voltage Sensor-containing Phosphatase) は, 膜電位センサードメインと, PTENと相同性を示す酵素ドメインを持ち, 実際に, イノシトールリン脂質を基質とするホスファターゼ活性を膜電位依存的に変化させる.

今回我々は, 膜電位センサードメインに点変異を導入して, gating currentの電位依存性が変化した変異体を作成し, それらの変異体では, 酵素活性の電位依存性も, 膜電位センサーの電位依存性と同様に変化することを見いだした. これにより, Ci-VSPの酵素活性の電位依存性が, 電位センサードメインによって制御されていることが確認された. また, イノシトールリン脂質を認識する蛍光プローブを用いることにより, 実際に細胞内のPIP₂濃度が変化していることを確認した.

さらに, Ci-VSPの膜電位センサードメインと酵素ドメインのリンカー部分の種々の変異体を作成し, 膜電位感受性と酵素活性がカップルする構造基盤を検討した.

5. Alteration of gene expression in cisplatin-resistant cancer KB cells and effects on volume-sensitive chloride current

○E.L. Lee^{1,2}, T. Shimizu¹, N. Takahashi¹, Y. Okada^{1,2} (¹Department of Cell Physiology, the National Institute for Physiological Sciences, ²Department of Physiological Sciences, School of Life Science, the Graduate University for Advanced Studies (Sokendai))

It was found previously in our laboratory that activity of the volume-sensitive, outwardly rectifying (VSOR) chloride channel is virtually absent in a cisplatin-resistant cancer KB (KB/CP4) cell line. In this study, an attempt was made to determine the molecular identity of the VSOR chloride channel or a regulator, using a strategy based on the fact that the KB/CP4 cell line, unlike the parental KB cell line from which it is derived, does not ex-

press VSOR chloride current. Candidates for differentially expressed genes were first identified by subtractive hybridization and a check of the literature. Six selected genes were then cloned into expression vectors and overexpressed in KB/CP4 cells to determine if they could restore VSOR chloride current expression. The overexpression of these genes did not result in restoration of the current, however. On the other hand, knockdown in non-resistant KB cells of one of the genes identified as being differentially expressed, GPI-specific phospholipase D1 (GPLD1), using siRNA, resulted in an enhancement of VSOR chloride current. This suggests that GPLD1 could possibly function to downregulate the current.

6. 神経特異的KCC2 (K⁻Cl⁻ cotransporter) のリン酸化と神経細胞障害時におけるGABA作用の経時的変化

○和気弘明, 渡部美穂, 鍋倉淳一 (生理学研究所 発達生理学系 生体恒常機能発達機構研究部門)

神経細胞に特異的に発現が認められるカリウムクロライドトランスポーターであるKCC2は発達により機能発現が認められ, Cl⁻の輸送を担い細胞内外のCl⁻濃度を調節することによりGABAの抑制性を担う分子である。

海馬の培養細胞14—21日目を用い, KCC2の障害時の機能の経時的変化を調べた。障害の方法としては酸化ストレスモデルとして, 過酸化水素, てんかんモデルとしてBDNFをもちいた。グラミシジンパッチクランプ法を用いて, GABAの平衡電位の経時的変化をしらべたところ過酸化水素添加1時間後よりKCC2の機能低下を示唆するCl⁻平衡電位の脱分極へのシフトが認められ, 6時間後にさらに上昇を認めた。この時間経過は過酸化水素負荷後6時間後のKCC2のタンパク量の減少, 1時間後のリン酸化KCC2の減少と一致した。このKCC2の脱リン酸化にてKCC2の細胞内分布の変化が認められた。KCC2機能低下と細胞死関連を調べたところ, KCC2強制発現細胞において細胞死は抑制され, 脱リン酸化酵素阻害剤であるソディウムバナデートで脱リン酸化を抑制すると3時間でのみ細胞死の抑制を認めた。

7. 低酸素虚血による選択的オリゴデンドロサイト前駆細胞障害に対するエリスロポイエチンの作用

○水野恵介^{1,2}, 飛田秀樹¹, 戸荻 創², 西野仁雄¹ (1名古屋市立大学大学院・医学研究科・脳神経生理学, ²先天異常・新生児・小児医学)

オリゴデンドロサイトの分化成熟においてlate oligodendrocyte progenitors (preOLs) が低酸素虚血 (H-I)

に選択的に脆弱であり, 未熟児に多い脳室周囲白質軟化症 (PVL) の病因と関連がある。P2-P4ラット脳内のpreOLsに選択的なH-Iを加え, 組織の変化が発生するかを調べるため, 右総動脈結紮 (RCAO) と様々な時間の6%低酸素負荷を加え48時間後に評価したところ, P3ラットを用いてRCAOと6%60分の低酸素負荷をかけた場合, 最もPVLに近い病態と考えられる, わずかな皮質構造の乱れと白質の部分的な脱落, ミクログリアの増生が認められた。

一方, エリスロポイエチン (EPO) に抗アポトーシス作用やグルタミン酸神経毒性の軽減といった細胞保護作用があることが報告されている。ラットPVLモデルに様々な量のEPOを腹腔内投与し, その影響について検討した。その結果, EPOを100, 50U/kg投与した場合にはH-I後の病理変化の軽減化が認められた。

以上の結果から, 6%60分の低酸素負荷による選択的preOLs傷害にEPOが有効であることが示された。

8. 神経幹細胞からのドーパミンニューロン分化における低酸素, Wnt signalの影響

○三角吉代, 飛田秀樹, 成田朋子, 金 泰善, 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)

障害された脳機能再建の移植ドナー細胞として神経幹細胞が注目されている。PDへの神経移植では神経幹細胞からドーパミンニューロンへの効率的な分化が課題となっている。本研究では, 中脳腹側部の正常発生過程を考慮する事でより効率的なドーパミンニューロンの分化誘導を目的とした。発達中の脳内は低酸素条件 (1-5%) である事が報告され, また, 発生時の中脳腹側部ではWnt5aが強く発現しドーパミンニューロン分化への関与が示唆されている。よって, 神経幹細胞における低酸素, Wnt5aのドーパミンニューロン誘導への関与を検討した。

5 step法によりES細胞由来神経幹細胞に対する低酸素 (3.5%) の影響を調べたところ, 小さなsphereを形成し, TH陽性細胞数が増加した。低酸素は, ES細胞由来の神経幹細胞においてドーパミンニューロンの分化促進の効果があると考えられる。

一方, クローニングしたWnt5aをPA6細胞にtransfectionsし, ES細胞, 中脳由来の神経幹細胞と共培養し, その影響を調べた。

これらより, 低酸素の負荷, Wnt5aの作用が神経幹細胞からのドーパミンニューロンの分化誘導に関与していることが考えられる。

9. 麻酔下マウスにおけるヒスタミンと血小板活性化因子の体血圧と門脈圧に対する作用

○劉 威, 崔 森, 高野博充, 倉田康孝, 芝本利重 (金沢医科大学 生理機能制御学)

我々はラットアナフィラキシー低血圧で門脈圧上昇を認め、それが低血圧に関与することを報告した。しかし、マウスにおける肝臓の役割は不明である。一方、マウスのアナフィラキシーには肥満細胞—ヒスタミンとKupffer細胞—血小板活性化因子 (PAF) の系が報告されている。そこで、マウスアナフィラキシー低血圧における肝臓の役割解明のため、ヒスタミンとPAFの体血圧と門脈圧への作用を検討した。麻酔下雄性BALB/Cマウス (体重24—28g) で体血圧 (Psa), 中心静脈圧 (Pcv), 門脈圧 (Ppv) 心拍数 (HR) を測定した。PAF (1.7—340 pmol) とヒスタミン (0.2—1.4 μ mol) は経静脈的に投与した。Psaはヒスタミン1.4 μ molにより20mmHg低下し、持続した。PAFでも低下し、高投与量 (170—340 pmol) では50mmHg以上低下した。いずれの薬剤でもPpvは低投与量より上昇し、Pcvは一過性の上昇後、Psa低下にともない低下した。PAFとヒスタミンはともに体血圧を低下させるとともに、門脈圧を上昇させることが判明した。このことはマウスでも犬やラットのアナフィラキシー低血圧と同様に門脈圧上昇が体血圧低下に関与しうる可能性を示唆する。

10. 胃酸分泌細胞におけるKCC3およびKCC4の発現

○藤井拓人, 糸見安生, 高橋佑司, 大平裕太, 森井孫俊, 竹口紀見, 酒井秀紀 (富山医科薬科大学・薬学部・薬物生理学)

胃酸 (HCl) のプロトンは胃H⁺, K⁺-ATPaseによって分泌されるが、塩素イオン分泌を担う分子実体が何であるのかについては未だ解明されていない。本研究ではK-Cl共輸送体 (KCC) に着目した。これまでに胃酸分泌細胞におけるKCCの発現は調べられていない。

我々はまずウサギ胃酸分泌細胞において、KCC1, 3, 4の遺伝子発現を確認した。次に、ウェスタンブロットによりKCC3とKCC4のタンパク質の発現を確認し、免疫組織染色によって、KCC3は胃酸分泌細胞の基底側膜に、KCC4は管腔側膜に局在していることを見出した。興味深いことに、KCC3, KCC4は共に酸分泌能の高い胃腺頸部の胃酸分泌細胞に高発現しており、酸分泌能の低い深部の胃酸分泌細胞における発現量は低かった。KCC3をLLC-PK1細胞に発現させたところ、内因性のNa⁺, K⁺-ATPaseの発現量は変化しなかったが、ウアバイン感受性酵素活性が有意に上昇した。したがってKCC3が基底側膜でNa⁺, K⁺-ATPaseと共役して胃酸分泌の抑制機構に関与している可能性が考えられる。KCC4が管腔側膜において、H⁺,

K⁺-ATPaseと共役して、Cl⁻分泌の分子実体として働く可能性について検討中である。

11. 胃プロトンポンプのリン脂質フリッパーゼ活性

○前田瑞樹, 森井孫俊, 山内理嗣, 竹口紀見, 酒井秀紀 (富山医科薬科大学・薬学部・薬物生理学)

胃酸分泌細胞の細管小胞由来である胃ベシクル膜上に、膜外層 (細胞質側) から内層 (管腔側) ヘリン脂質を一方方向性に輸送するリン脂質フリッパーゼ活性が存在することをすでに報告した。このリン脂質フリッパーゼ活性は、ATP加水分解に依存することや、SCH 28080, SPI-447, omeprazole, rabeprazoleのような作用機序の異なる複数の胃プロトンポンプインヒビターで阻害されることから、胃プロトンポンプの関与が予測された。胃プロトンポンプをブタ腎上皮由来細胞であるLLC-PK1細胞へ安定発現させた細胞系を樹立し、蛍光性グリセリン脂質アナログ (NBD-PC) を用いて細胞がリン脂質フリッパーゼ活性をもつかどうか検討した。胃プロトンポンプ安定発現細胞株において、細胞外へのリン脂質転移活性は増加し、その増加はK⁺競合可逆のプロトンポンプ阻害剤SCH 28080で濃度依存的に阻害された。これらの結果から、胃プロトンポンプがリン脂質転移に直接関与することが示唆された。

12. ウサギ膝窩リンパ節のリンパ循環動態に対するリンパ力学的解析

○永井 崇, 伊古美文隆, 鈴木 滋, 水野理介, 大橋俊夫 (信州大学医学部器官制御生理学)

腫瘍リンパ節転移の診断に、近年、標識コロイド状粒子が多く用いられている。しかしながら、組織間隙に投与されたコロイド状粒子のリンパ節への分布特性の決定因子は未だほとんど解析されていない。そこで今回、我々の確立した *in vivo* リンパ節灌流モデルを用いて、粒子輸送に対して大きく影響すると考えられる、リンパ節におけるリンパ循環動態について検討を行った。実験には白色家兔を用い、麻酔後、膝窩リンパ節の節前・節後リンパ管内へ各々順行性・逆行性にポリエチレンチューブを挿入し、保生液のリンパ節灌流時における圧—流量関係を評価した。この結果、流出圧一定で注入圧を上昇させると注入圧の変化に応じて流出速度は直線的に増加した。これに対して、注入圧一定で流出圧を変化させた場合の流出は -15cmH₂O以下ではプラトーとなり、-15~5cmH₂Oでは直線的に低下し、これ以上の流出圧では停止した。この研究により、リンパ節の灌流における基本的な圧—流量関係が明らかとなった。今後、リンパ節のリンパ循環動態に対する種々病態の影響について検討を進めてゆきたい。

13. サル前頭眼野ニューロンのタイプ分類と相互相関

片井 聡, ○石川直樹, 猿渡正則, 井上雅仁, 三上章允
(京都大学霊長類研究所 行動発現分野)

大脳皮質には, 異なる機能特性を持った複数のタイプのニューロンが存在し, 局所回路を形成している. これらの細胞は, 組織学的研究や細胞内記録によりタイプ分類されている. しかし, 無麻酔で行動する動物の研究では, こうしたタイプに注目して解析されることは少なかった.

そこで, 学習課題遂行中のサル前頭眼野から細胞外記録したニューロンのタイプ分類を行った. Burst発火の有無, および, その発火パターンを手がかりとすることで, Burst発火しないRS (Regular Spiking) 細胞, Burst発火するFS (Fast Spiking) 細胞, FRB (Fast Rhythmic Bursting) 細胞, IB (Intrinsic Bursting) 細胞の4タイプに分類した. つぎに, 同時記録した2つのニューロンの相関を調べた. その結果, RS細胞から他のタイプへの相関は, 38%が興奮性で, 4%が抑制性であった. 一方, FS細胞から他のタイプへの相関は, 11%が興奮性で, 56%が抑制性であった.

以上から, 前頭眼野のニューロンは, 発火パターンを手がかりとして4タイプに分類できること, また, RS細胞とFS細胞とでは, 標的細胞に与える影響の異なることが示唆された.

14. Hippocampal place cells encode a moving object

○A.S. Ho^{1,2}, T. Kobayashi^{1,2}, E. Hori^{1,2}, K. Umeno^{1,2}, T. Ono¹, H. Nishijo^{1,2} (System Emotional Neuroscience, Toyama Med. & Pharmaceu. Univ., Toyama, ²CREST, JST, Tokyo)

To investigate relationship between hippocampal (HF) place cell activities and a moving object in a maze, we analyzed place cell activities of rats freely moving in an open field with a remote-controlled car toy. Of a total of 133 place cells recorded, activity of 40 was significantly modulated by the car speed and/or distance between the car and rat. This results suggest that HF encodes not only spatial information of own location, but also that of other moving object in an environment.

15. Ameliorative effects of a neuroprotective agent, T-817MA, on place learning deficits induced by continuous infusion of amyloid- β peptide in rats

○N.T.H. Phuong^{1,4}, T. Kimura^{2,4}, T.H. Anh^{2,4}, N. Iwakami³, Y. Nakada³, H. Nishijo^{1,4}, T. Ono^{2,4} (System Emotional Science, and ²Dept. Molecular and Integrative Emotional

Neuroscience, Toyama Med. & Pharmaceu. Univ.; ³Toyama Chemical Co., Ltd. Research Laboratories; ⁴CREST, JST.)

We investigated the effect of T-817MA on place learning deficits in rats with A β -induced hippocampal damages. The A β -infused rats without the treatment of T-817MA displayed learning impairment. Treatment of T-817MA significantly improved the task performance of the A β -infused rats. The results demonstrated that T-817MA ameliorated learning deficits induced by A infusion, which might be attributed to neuroprotection in the hippocampus.

16. 海馬錐体細胞の膜流動性は加齢により低下する

○深谷泰亮, 権平 巧, 檜八重泰斗, 榊原 学 (東海大学開発工学部生物工学科)

加齢に伴うラットの行動変化と海馬の活動を対応付けた. 実験はFischer-344ラット21-24ヶ月齢(OC)を, 対照には2ヶ月齢動物(YC)を用いた. モーリス水迷路学習ではOCは逃避台への到達潜時, 遊泳速度などが有意に遅かった. それぞれの動物の摘出海馬切片を多点電極上に置き, 歯状回へのテタヌス刺激による長期増強現象(LTP)を観察した. LTP増強の程度はOCがYCに比べ有意に小さかった. LTP誘発の錐体細胞へのCa²⁺流入路として, NMDA受容体と電位依存性Ca²⁺チャンネル(VDCC)を介するものに区別し, チャンネル抑制剤によって分離したところ, OCではVDCC, YCではNMDA受容体を介するものが優勢であった. 加齢に伴い海馬神経細胞においてNMDA受容体が減少し, 細胞膜の粘性が増加するとの報告があることから, 海馬神経細胞の膜流動性を共焦点顕微鏡システムで蛍光退色回復法で検討した. DiI-Cで染色した細胞体の一部を小光点で退色させ, その後の蛍光強度の回復過程を解析した. 回復は1次の拡散方程式で近似され, OCでは, 時定数で有意に大きく, 一方, 拡散係数, 回復率はいずれも有意に小さかった. これらの結果は, 加齢に伴う膜流動性の低下は動物の空間認知機能の減弱と平行することを示唆した.

17. ゼブラフィッシュの視神経再生に関わるガレクチン-1の研究

○太田景子, 永島幹子, 加藤 聖 (金沢大・院医・脳情報分子学)

哺乳類では視神経の軸索に損傷をうけると神経節細胞で細胞死が起こり再生しないが, 魚類では細胞死は起こらず軸索が再伸長され視神経が再生する. ガレクチンは糖認識

ドメインをもち、 β -ガラクトシドに結合する動物レクチンで、無脊椎から脊椎動物に広く存在し、ガレクチンファミリーには14種類ある。近年、ガレクチン-1は末梢神経系の再生を促進する因子であると報告されている。そこで、本研究ではこのガレクチン-1の中樞神経での役割に着目した。ガレクチン-1は網膜で発現がみられ、視神経切断後、飼育日数の異なるゼブラフィッシュの網膜を経時的に採取し、mRNAの発現量の変化をRT-PCRで、発現部位をin situハイブリダイゼーションで行った。mRNAは切断後すぐに増加し、3~5日目でピークを迎え、神経節細胞層で発現が見られた。タンパク質の発現部位は免疫組織化学染色を行い、正常網膜では神経節細胞層、内網状層、視神経線維層が染まった。切断後には視神経線維層と視神経で強く発現した。中樞神経の突起伸展作用を網膜組織片培養で調べた。ガレクチン-1のリコンビナントを添加したところ、有意な突起伸展がみられた。以上のことより、ガレクチン-1は神経節細胞に直接ないし間接的に作用し視神経再生を促す分子であると考えた。

18. 画像処理を用いたゼブラフィッシュの視神経再生過程における行動解析

○村松孝紀¹、布目知也²、村本健一郎²、加藤 聖¹ (¹金沢大院・院医・脳情報分子学、²金沢大院・自然科学・電子情報工学専攻)

魚類の視神経は切断しても再生することが知られている。我々は視神経再生過程を評価する方法として、CCDカメラとコンピュータを使いゼブラフィッシュの視覚依存性行動に着目し、2匹の追尾行動を観測・解析するシステムを開発してきた。本研究では、縞模様円筒ドラムを回転させ、その中にゼブラフィッシュの入った水槽を入れることで、行動を評価した。これにより、視神経切断直後は縞を認識しなかったが、切断後約10日目から縞を認識する傾向が見られ、切断後約25日目には正常なゼブラフィッシュと同様の行動を示した。この結果は、視蓋へのHRPトレーシング結果による、神経軸索が再び視蓋へ到達する時期とほぼ一致する。また、ゼブラフィッシュが縞をより最適に認識する円筒ドラムの回転速度は130 [deg/s]で、縞の間隔は2.5cmと分かった。以上から、本システムは魚類の視神経再生過程(特に、再生繊維が視蓋への到達)を行動学の観点から評価する良い装置であると結論した。

19. 両側の一次運動野が頸髄レベルでの皮質脊髄路損傷後の手指の機能回復に貢献する

○西村幸男^{1,5}、伊佐 正^{1,5}、パーフィリエフ・セルゲイ²、

尾上浩隆^{3,5}、塚田秀夫^{4,5} (¹生理研・認知行動発達、²イェテボリ大・生理、³東京都神経研・心理、⁴浜松ホトニクス、⁵JST・CREST)

我々は、頸髄C4/C5で皮質脊髄路(CST)を切断したサルにおいて切断後1ヶ月で精密把持が回復することを見出した。本研究では、頸髄C4/C5でCSTを切断したサルの手指の機能回復には如何なる中樞神経機構が作用しているか検討した。精密把持運動中に脳機能イメージングを行なった結果、切断後1ヶ月及び3ヶ月後に共通して、両側の一次運動野(M1)において活動の増大が観られた。そこで、両側M1が機能回復に貢献しているか検討するために、それぞれの領域にGABA agonistのムシモルを注入し、CST切断前後において精密把持を観察したところ、切断反対側のM1への注入では切断前、切断後2週間、3ヶ月後に精密把持の成功率が低下した。しかしながら、切断同側M1への注入では、切断後2週間後のみに成功率の低下が観られた。以上より、C4/C5でのCST切断後の手の機能回復には、切断の反対側M1のみならず、切断前には精密把持には貢献していなかった同側M1も機能回復に貢献していることが示唆された。

20. 加齢ラットにおける遅発性筋痛(DOMS)について

○松田 輝^{1,2}、田口 徹¹、那須輝顕¹、田村良子¹、水村和枝¹ (¹名古屋大学環境医学研究所 神経性調節分野、²名古屋大学大学院医学系研究科 リハビリテーション療法学専攻)

不慣れな運動後に生じる筋痛(遅発性筋痛: DOMS)は筋の圧痛を主な特徴とし、強度で不慣れな運動を行ってから24~72時間後にピークとなる。我々は、若年ラット(8週齢)に伸張性収縮(ECC)を負荷し、筋圧痛閾値、脊髄後角におけるc-Fos発現を指標に、ラットにおいてもDOMSが生じることを示した。そこで今回、130~139週齢の加齢ラットを用いて、長指伸筋(EDL)にECCを負荷し、圧痛閾値測定とc-Fosの脊髄後角における発現を指標に加齢によるDOMSの変化を調べた。その結果、圧痛閾値は若年ラットではECC後1~3日目まで有意に低下し、4日目に戻ったが、加齢ラットでは、1~5日目まで有意に低下し、7日目で戻り、遅発性筋肉痛が長く続くことが明らかになった。ECC3日後に運動筋を圧迫刺激することによって生じるc-Fos蛋白発現は、若年ラットでは脊髄L4レベルの後角表層にのみ有意に増加したが、加齢ラットでは脊髄L4に加えL5レベルの後角表層にも有意な増加が観察され、筋からの痛み情報が若年ラットよりも脊髄の広いレベルに伝達されることが明らかになった。

21. 皮脂厚の違いによって経皮的圧刺激の効果は異なるか?—経皮的圧刺激に対する組織内応力分布の3次元有限要素法による推定

○高橋 賢, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所・神経性調節分野)

筋痛の程度を調べる際に経皮的圧刺激が用いられるが、圧刺激によって筋組織に生じる応力を実験的に測定するのは困難である。我々はこの経皮的圧刺激によって組織内に生じる応力を、3次元有限要素法を用いたシミュレーションで推定し発表してきた。今回は同じ圧刺激条件下で、皮下脂肪の厚さの違いによって筋に生じる応力が異なるかを解析した。

MRIで撮影したヒト前腕部の断層画像を用い皮膚、皮下組織(厚さ2.34mm)、筋、骨の4層から成る生体組織の3次元モデル(低皮脂厚)を構築した。これを基に皮脂厚が5.37mmの高皮脂厚モデルを作成した。これらのモデル組織に対し直径12.3mmの円柱形プローブで302.5g重の力を与え、組織内に生じる応力分布を求めた。

302.5g重の圧刺激を与えたときの最大Mises応力の筋組織/皮膚組織比は、低皮脂厚モデルで0.453、高皮脂厚モデルで0.376であった。圧刺激プローブの変位量は低皮脂厚モデルにおいて5.13mmであり、被験者実験から得られた変位量5.2mmと近い数値を示した。

この結果より経皮的圧刺激を与える場合、同じ力を与えても皮脂厚が厚い場合には力が筋に到達する割合が小さいことが示唆された。

22. ラット週齢による慢性痛症発症の差異

○櫻井博紀¹, 橋本辰幸¹, 大道裕介¹, 吉本隆彦^{1,2}, 高畑成雄^{1,3}, 江口国博^{1,4}, 山口佳子¹, 熊澤孝朗¹ (愛知医科大学痛み学講座,²名古屋大学大学院医学系研究科,³札幌医科大学大学院医学研究科,⁴愛知学院大学歯学部生理学講座)

慢性痛症において、成人に比べ小児では発症する割合が少ないとの報告があり、その要因として神経系の発達の影響が考えられている。今回、我々の開発した筋傷害性慢性痛症モデルにおいて、週齢の差による慢性痛症発症の違いを調べることにより、生後発達と慢性痛症発症との関連について検討した。

モデル動物はラットで、一側腓腹筋内側頭にLPSに続き高張食塩水を反復投与することで作製した。このモデルは足底での痛み行動が両側性に亢進し、10週以上持続する。

9週齢処置群(9w群)を対象として、3, 4, 6週齢の各時期に処置を施した3群(3w群, 4w群, 6w群)を比較

した。3w群では処置後1週までの痛み行動の亢進は出現するが、処置後2週から亢進は減弱した。3w群での処置後2週から13週までの痛み行動は9w群と比較し有意に低かった。また、4, 6w群と処置週齢が遅くなると、より9w群の痛み行動のパターンに近づいた。このことより、処置週齢により痛み行動の亢進に差があることが示され、若齢では慢性痛症に至りにくい可能性が示唆された。

23. 2種類の慢性痛症モデル動物の開発とその比較検討—各モデルでのlipopolysaccharide (LPS) による効果の違い—

○高畑成雄^{1,2}, 大道裕介¹, 橋本辰幸¹, 櫻井博紀¹, 吉本隆彦^{1,3}, 江口国博^{1,4}, 山口佳子¹, 熊澤孝朗¹ (愛知医科大学医学部痛み学講座,²札幌医科大学大学院医学研究科整形外科学,³名古屋大学大学院医学系研究科,⁴愛知学院大学歯学部生理学講座)

我々は筋を中心とした運動器に着目し、軟部組織損傷後に生ずる慢性痛症の新しい2種類のラットモデル(筋傷害性モデル, ギプス固定モデル)を開発し報告を行ってきた。これらのモデルにおいてlipopolysaccharide (LPS)の明らかな効果の違いが認められたので報告する。

ギプス固定モデルは、2週間の片側下肢ギプス固定によりギプス除去後から足底刺激に対する痛み行動が両側性に長期亢進を示す。筋傷害性モデルは、片側腓腹筋にLPS+6% hypertonic salineを投与することで同様に痛み行動が長期亢進を示す。これらの結果よりLPS投与後に2週間のギプス固定を行う群を作製したがこの群では痛み行動が抑制される結果となった。

各モデルにおけるLPSの効果の違いについて、また痛み行動の長期亢進を導く因子について予備実験の結果も含めて考察する。

24. プロスタグランジンによるTRPV1機能制御機構

○東 智広^{1,2}, 森山朋子¹, 富樫和也^{1,2}, 飯田陶子¹, 瀬木恵理³, 杉本幸彦⁴, 富永知子^{1,2}, 成宮 周³, 富永真琴^{1,2} (岡崎統合バイオ・細胞生理,²総研大・生理科学,³京都大・院・医・神経細胞薬理,⁴京都大・院・薬・生体情報制御)

炎症や疼痛の発生に重要なプロスタグランジンE₂(PGE₂)及びI₂(PGI₂)とカプサイシン受容体TRPV1の機能連関を検討した。野生型及びTRPV1欠損マウスを用いた行動薬理的解析から、個体レベルでのTRPV1とPGE₂の機能連関が明らかとなった。次に異所性発現系において検討したところ、PGE₂によるTRPV1活性の増強にEP₁受容体が関与することが観察された。また、熱によ

る活性化温度閾値も41度から31度に低下したことから、体温でも疼痛を発生しうるものと推定された。PKC阻害薬やPKCによるリン酸化部位の変異体ではその効果がみられないことから、PGE₂はEP₁活性化からPKCによるTRPV1のリン酸化を介してTRPV1の機能を増強していると考えられた。PGE₂と同様にPGI₂もまたIP受容体活性化からPKC経路を介してTRPV1の機能を増強させることが明らかになった。以上のように、炎症時に放出されるプロスタグランジンの炎症性疼痛発生にPKCを介したTRPV1の機能増強が強く関わっていることが明らかとなった。

25. PMAによる脱感作したTRPV1の再感作にはPKC εによるSer800のリン酸化が関与している

○S. Mandadi¹, 富永知子¹, 村山奈美枝¹, 飯田陶子¹, 沼崎満子², B.D. Roufogalis³, 富永真琴¹ (1岡崎統合バイオ・細胞生理, 2筑波大・医・麻酔, 3シドニー大・薬理)

脱感作とリン酸化はカプサイシン受容体TRPV1の機能制御に重要である。パッチクランプ法とCa²⁺イメージング法を用いて、PMAによる脱感作TRPV1の再感作機構を検討した。再感作はPKCによるTRPV1のリン酸化によって起こることが分かった。Ser800をリン酸化したTRPV1を認識する抗体を作製したところ、非刺激時でもリン酸化TRPV1が観察され、リン酸化TRPV1量はPMA刺激によって著しく増大した。また、HEK293細胞、CHO細胞、HeLa細胞にTRPV1を強制発現させてPMA刺激によるリン酸化TRPV1量を検討すると、リン酸化がPKC εの発現量に強く依存していることが明らかとなった。これらのことから、脱感作TRPV1の再感作にはPKC εによるSer800のリン酸化が強く関わっているものと考えられた。この抗リン酸化TRPV1抗体は炎症の研究に有用であると思われる。

26. 神経伝達物質刺激による培養腸管神経節グリア細胞の膜電位応答及びイオンチャンネル開口

○木村知温, 志賀翔一, 齊藤大輔, 掛あかり, 太田和徳, 鈴木和夫 (東海大学医用生体工学科)

グリア細胞は中枢神経系においてシグナル伝達の重要な役割を演じていることが示唆されている。しかし腸管神経節グリア細胞の性質や機能は不明である。モルモット盲腸結腸紐下の筋層間神経叢培養グリア細胞を用いて伝達物質刺激による膜電位応答、イオンチャンネル開口及びレセプターをパッチクランプ法で調査した。グリア細胞の膜電位は平均-36mVであった。イオンチャンネルはコンダクタンス約15pSのnonselective cationチャンネル、low conductance

Cl⁻ (約32pS) と high conductance Cl⁻ (158pS) チャンネル、及び電圧活性のK⁺チャンネル (約107pS) が存在した。AChとATPは過分極応答を起こし、ACh刺激に反応するチャンネルはK⁺チャンネルであると思われる。Adrenalineとglutamic acidは脱分極応答を生じ、関与するチャンネルはCl⁻チャンネルと考えられる。ACh, adrenaline及びglutamic acidのレセプターは、それぞれ muscarinic, β-adrenergic 及び non-NMDA レセプターと思われる。

27. 発達期の脳皮質辺縁帯のシナプス伝達におけるCl⁻ホメオスタシスの役割の光学的・化学的解析

○千太哲¹, 中村直人², W. Kilb⁴, 古川智範¹, 山田順子³, H.J. Luhmann⁴, 中原大一郎², 福田敦夫^{1,3} (1浜松医大・医・生理第一, 2浜松医大・医・心理学, 3静岡大・院・電子科研, 4Inst. Physiol. Pathophysiol. J. Gutenberg Univ. Mainz, Germany)

発達期の脳皮質辺縁帯に存在するCajal-Retzius細胞は脳皮質層構造の構築に重要な役割を果たすことが知られている。そこでP0-3ラット辺縁帯のtangential sliceを作成して電位感受性蛍光色素JPW1114を用いた膜電位イメージング法により興奮伝播を測定し、この興奮伝播はCNQXとAP5でグルタミン酸受容体を遮断しても殆ど影響を受けなかった。しかしBICによるGABA_A受容体遮断や、STRによるグリシン受容体の遮断により興奮伝播は減弱した。さらにBMTによるNa⁺, K⁺-2 Cl⁻共輸送体の抑制によっても興奮伝播は減弱した。また細胞外に存在しているアミノ酸をmicrodialysis法を用いて測定したところ単発刺激でタウリンとGABAが増加され、さらにTTX存在下でタウリンは活動電位依存して放出されることが示唆された。

28. ゼブラフィッシュの逃避運動の発現を担う後脳分節間相同ニューロンの階層的活動様式

○小橋常彦, 小田洋一 (名大・院・理・生命理学)

硬骨魚の後脳網様体脊髄路(RS)ニューロン群は、形態学的に類似した相同ニューロンが隣接する後脳分節(r1-7)内に繰り返される。相同ニューロン同士は機能的にも似ていると推測されている。

なかでも、最大のRSニューロンであるマウスナー(M)細胞と、その相同ニューロンのMiD2cm, MiD3cmはM-seriesと呼ばれ、逃避運動の制御に関与すると考えられている。

この仮説を確かめるため、我々は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、逃避運動中のゼブラフィッシュ稚魚からニューロンのCa²⁺イメージングを行い、逃避運動とM-series

の活動との対応を調べた。

頭部への水流刺激に対して、M細胞とMiD3cmの活動が観察された。大半の逃避運動はM細胞の発火を伴い、最短潜時で開始した(M-escape)。このときMiD3cmの活動は抑圧されていた。M細胞が発火しなかったり、レーザー照射で破壊されても、低確率で長潜時の逃避運動(Non-M escape)が起こり、その場合はMiD3cmの強い応答を伴った。

以上より、逃避運動の発現にはM細胞を介する回路とMiD3cmを介する回路が重複して相補的に働くが、通常はM-escape回路が優先して働き、侵害刺激に対してより素早く逃げると考えられる。

29. 上オリーブ核に入力する抑制性シナプス前終末のGABA_B受容体のはたらき

○西巻拓也, 張一成, 鍋倉淳一(生理研・生体恒常機能発達機構研究部門, 総研大, CREST JST)

聴覚中継路核である外側上オリーブ核(LSO)は内側台形体核(MNTB)から抑制性の入力を受けており、音源定位に重要な働きをしている。この抑制性入力は、発達に従いGABAからグリシンへスイッチする。この抑制性入力が幼若期にGABAである生理学的意義を解明するために、我々は入力シナプス前終末に存在するGABA_B受容体に注目し、その機能的役割について電気生理学的な検討を行った。

LSOニューロンにホールセルパッチクランプ法を適用して、MNTB刺激によって惹起される抑制性シナプス電流(IPSC)を記録した。幼若期(P8-11)ではテタヌス刺激下では内因性GABAによって神経終末のGABA_B受容体を介する伝達抑制が起こった。しかしこの伝達抑制はP16-18では消失した。また、GABA_B受容体選択的アゴニストであるbaclofenによって抑制されるIPSCの振幅は、幼若期(P2-11)のラットでは有意に抑制され、paired-pulse ratioも増加したが、P16-18ではこの抑制は見られなかった。以上の結果から、GABAからグリシンへスイッチする時期に入力する終末のGABA_B受容体の機能が消失することが示唆された。

30. 環境温度の変化がラットのLPS発熱反応に与える影響

○宇野忠, 柴田政章(山梨県環境科学研究所・生気象学研究室)

本研究では、夏冬での室内外往復時などの環境温度変化を受けた時に生体内恒常性が受ける影響を動物モデルを通して解明することが目的である。ラットを25℃環境、持

続的な4℃寒冷環境、4℃と27℃間を1時間サイクルで変化する繰り返し温度変化環境の3種類の条件で1~10日間の曝露を行い、ストレス指標として血漿中コルチコステロンの測定を行った。10日間にわたり寒冷、繰り返し温度変化曝露とも25℃曝露よりも、さらに1, 2, 4日間において繰り返し温度変化曝露では寒冷曝露よりも高い値を示し、環境温度の繰り返し変化がより強いストレスを与えることを明らかとした。次に体温測定用テレメトリーセンサー埋め込みラットをコルチコステロン濃度に顕著な差がみられた2日間曝露した後、LPSの腹腔内投与により引き起こされる発熱反応の比較を行った。寒冷、繰り返し温度変化曝露共に25℃曝露より発熱反応の増強が見られた。また2日間曝露に加え25℃環境にて1日間さらに曝露しコルチコステロンが通常レベルに戻った状態ではさらなる増強が観察されたことから、増加したコルチコステロンの直接的な作用によるものではなく、環境温度変化に伴うストレス環境がLPS発熱反応へ何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

31. 半年間の運動が女子学生のエネルギー摂取に及ぼす影響

青木貴子(岐阜市立女子短期大学・食物栄養学科)

運動でエネルギー消費が増えると、エネルギー摂取も増えるのかどうかを調べた。

5名の女子学生に半年間のエルゴメータ運動を負荷した。運動は、低強度2分高強度1分の繰り返しを30-45分、週2, 3回実施した。運動しない5名の対照群を設けた。運動期間をはさんで秤量法による食事調査を行った。食事には介入しなかった。

摂取エネルギー量の平均値(kcal/日)は、運動期間前、運動群1680, 対照群1530だった。運動期間後は、運動群では平均で149減少した。運動群5名のうち4名で、蛋白質・脂肪・糖質の全てが減少した。一方の対照群では平均で20, 逆に増加した。対照群の蛋白質・脂肪・糖質の増減は特定の傾向はなかった。エネルギー摂取量, 各エネルギー源摂取量に、運動群と対照群との間の有意差はなかった。

熱量比は蛋白質:脂肪:糖質(%)で、運動期間前、運動群13:29:57, 対照群14:27:58, 運動期間後は、運動群13:28:58, 対照群14:28:56だった。運動群5名中4名で脂肪割合が減少したほかは、特に目立つ変化はなかった。どの項目にも2群間の有意差はなかった。

以上の結果から、中等度の強度の30分運動では、エネルギー摂取量は増えるとは言えないし、エネルギー源の脂肪比率が増えるとは言えない。

P1. ヒト心室筋由来バイオペースメーカー細胞の作成と構造安定化のためのシステム設計に関する非線形力学的解析

○倉田康孝, 芝本利重 (金沢医科大学・生理機能制御学)
近年, 内向き整流 K^+ チャネル電流 (I_{K1}) の抑制により心室筋由来ペースメーカー細胞が作成され, バイオペースメーカー (BP) 開発が期待される。我々はヒト心室筋モデルの分岐構造解析を行い, I_{K1} 抑制によるBP細胞作成並びに構造安定化のためのシステム設計について検討した。モデルシステムの平衡点とダイナミクスのパラメータ依存性を示す分岐図を作成し, I_{K1} 抑制時の分岐構造と電気緊張性負荷に対する構造安定性を解析した。過分極誘発内向き電流 (I_h), 持続性内向き電流 (I_{st}), 低電位活性化L型 Ca^{2+} 電流 (I_{CaLD}) の分岐構造への影響を検討した。自動能発現に必要な I_{K1} 抑制率は各内向き電流の導入により減少したが, 内向き電流の導入のみではBP細胞は作成できなかった。BP細胞と心室筋細胞を連結したカップル細胞モデルでは, ギャップ抵抗の減少に伴ってBP細胞の自動能は抑制されたが, 電気緊張性負荷に対する構造安定性と心室筋ドライブ機能は, I_{st} 又は I_{CaLD} の導入により劇的に向上した。以上より, BP細胞の作成には I_{K1} 抑制が不可欠であり, 電気緊張性負荷に対する構造安定性と心室ドライブ機能の強化には I_{st} 又は I_{CaLD} の導入が有効であると結論した。

P2. 金魚由来分子による哺乳類損傷視神経再生の試み

○加藤 聖¹, 郡山恵樹¹, 杉谷加代² (¹金沢大学大学院医学系研究科脳情報分子学, ²先端医療技術学)

一般的に哺乳類中枢神経軸索は損傷を受けるとアポトーシスに陥り再生しない。一方, 魚類の中枢神経は損傷を受けても軸索が再伸長し, 機能も回復する。このことは, 魚類の中枢神経細胞には損傷後, 修復ないし再生させるための遺伝子・分子の発現が上昇し, 逆に哺乳類でアポトーシスの起こる前に減少する遺伝子・分子があるとすればこの分子を補充すれば哺乳類の損傷中枢神経を再生させることができるのではないかと考え, 金魚とラットの損傷視神経をモデルとして, この可能性を検討した。その結果, 金魚網膜トランスグルタミナーゼ (TG_R) がこの条件を満たす分子の一つであった。 TG_R mRNA・蛋白は, 金魚網膜では神経節細胞にのみ損傷後5~10日で上昇し20~30日でピークとなりその後コントロール値に復した。また, ラット網膜では, TG_R 蛋白は神経節細胞でのみ損傷後1~3日で減少し, アポトーシスの始まる5~7日後までに消失した。この TG_R のリコンビナント蛋白を成熟ラット網膜片培養に添加した所, 著明な神経突起の伸長が観察された。以上この金魚およびラット網膜での二重選別法によりヒト

を含めた中枢神経障害の克服を目指した新しい創薬の可能性が期待される。

P3. ラマン分光法を用いた口腔内硬組織の分光学的解析

○中村浩二¹, 根川常夫², 松山幸枝², 柴田敏之³, 恵良聖一² (¹岐阜医療技術短大・衛生技術, ²岐阜大・院医・分子生理学, ³岐阜大・院医・口腔病態学)

唾石は唾液腺に生じる石灰化物で, ラマン分光法を用いた分析はほとんど行なわれていない。今回我々は, FT-ラマンを用いて唾石を測定し, その対照として歯牙硬組織, 骨組織, また種々合成アパタイト結晶を測定し比較検討した。

10症例の唾石の断面を測定した。なお2症例からは各々2個の唾石を得た。また対照として下顎8番埋伏歯, ラット上腕骨, ハイドロキシアパタイト (HAP) 結晶, α , β -TCP等を測定した。ラマンシステムは, 日本電子社製JRS-FT6500Nを使用し, レーザーはNd:YAG laser, 励起波長1064nm, 出力200mWで測定した。

ラマンスペクトルの解析から, 唾石はリン酸カルシウムを主成分とするHAP構造に近いものであると考えられた。同人患者から各々2個の唾石を得た症例では, 両唾石のスペクトルがほぼ同じであることから, 各個人によって石灰化の条件は固有な特徴を示すことが示唆された。得られたラマンスペクトルの特徴から, HAP構造に近いグループ, HAP構造中にタンパク質の含有が多いグループ, そして炭酸塩の含有が多いグループに分類することができた。

P4. 短鎖脂肪酸のラット遠位結腸運動に対する影響

○唐木晋一郎¹, 三井 烈¹, 小野茂之^{1,2}, 桑原厚和¹ (¹静岡県立大学・環境科学研究所・環境生理学研究室, ²花王株式会社)

短鎖脂肪酸は, 大腸, 特に盲腸や近位結腸において腸内細菌による食物繊維の発酵作用により産生され, 糞塊とともに遠位結腸へと輸送されてゆく。短鎖脂肪酸は栄養分として吸収される他, 粘膜を刺激することによって蠕動運動や分泌反射といった様々な生理作用を誘発することが知られている。しかしながら, その作用機序については不明な点が多い。そこで我々は, まずラット遠位結腸粘膜一輪走筋あるいは縦走筋標本を作製し, 各短鎖脂肪酸による収縮反応および自発収縮に対する影響を検討した。その結果, プロピオン酸と酪酸の誘発する一過性収縮は5-HT₁受容体及びムスカリン様ACh受容体を介した神経反射であり, 持続性の収縮にはプロスタグランジンの産生が関与するこ

とを見出した。次に、短鎖脂肪酸をリガンドとすることが最近報告されたGPR43について、ラット遠位結腸における発現を、RT-PCR, Western blot及び免疫組織化学により検討した。その結果、GPR43は粘膜上皮のPYY含有腸内分泌細胞と、粘膜固有層の5-HT含有肥満細胞に局在していることを見出した。以上の結果から、GPR43が短鎖脂肪酸の誘発する様々な生理作用に関与することが示唆された。

P5. ナトリウム依存性糖輸送体によるシスプラチン細胞障害の軽減

○五十里 彰¹, 原田 均², 高木邦明³, 三輪匡男¹ (¹静岡県立大・薬・臨床薬品学, ²静岡県立大・薬・衛生化学, ³静岡県立大・薬・病態薬学)

シスプラチンは固形癌の治療薬として使用されているが、腎障害という強い副作用により使用量が制限されている。近位尿細管に高濃度のシスプラチンが蓄積するが、どのようなメカニズムを介して細胞障害が引き起こされるのかは不明である。本研究では、高濃度シスプラチンによる細胞障害のメカニズムを解明し、ナトリウム依存性糖輸送体(SGLT1)が内因性の防御機構として働くのかを検討した。LLC-PK₁細胞を高濃度のシスプラチンで処理したところ、上皮膜間電気抵抗値(TER)の減少とネクロシスによる細胞死が観察された。SGLT1阻害剤のフロリジンは、シスプラチンによるTERの減少と細胞死の割合を増強した。一酸化窒素産生阻害剤(L-NAME)やパーオキシナイトライドのスキャベンジャー(FeTPPS, GSH)はTERの減少を抑制し、タイトジャンクションの崩壊を阻害した。以上のことから、近位尿細管上皮細胞に蓄積した高濃度のシスプラチンは、パーオキシナイトライドの産生を介して、腎障害を引き起こすと考えられる。また、SGLT1はパーオキシナイトライドの産生を抑制することにより、腎障害を軽減すると示唆された。

P6. 第二次視覚野での輪郭の折れ曲がりの表出における線成分表出の寄与

伊藤 南(生理学研究所・生体情報研究系・感覚認知情報研究部門)

我々は輪郭線中の折れ曲がりの表現の神経機構を探る為に、二本の半直線を66通りに組み合わせ折れ曲がり刺激を作成し、注視課題を遂行中の二頭のサルに第二次視覚野のII/III層より単一細胞記録を行い、折れ曲がり刺激に対して選択性を示すニューロンが多数存在することを見出した。選択性形成の機構を明らかにするために、個々の半直線に対する反応による比較的単純な加算モデルで66

刺激に対する反応を説明できるかどうかを検討した。単純加算モデルでは、最適刺激に対する反応がよく再現される一方で、それ以外の刺激に対する反応が過大評価されて選択性が低下した。そこで1) 方位選択的な抑制性入力、2) 整流効果、3) 方位選択性入力のオーバーラップの要素を加えてモデルを修正して半直線に対する反応をシミュレーションしたところ、折れ曲がり選択性をよく説明できることが明らかになった。モデルは最適な半直線が一本しかない場合の折れ曲がり選択性形成や組み合わせ刺激に対するゲインの調整メカニズムの存在を示した。これらの結果は第二次視覚野が1) 方位選択的な興奮性および抑制性の半直線情報の組み合わせにより様々な折れ曲がりを出し、2) 輪郭線の折れ曲がりや分岐を検出する最初のステップを担うことを示唆する。

P7. マカクザル盲視モデルにおける残存視覚と認知機能

○吉田正俊^{1,2}, 伊佐 正^{1,2,3} (¹生理学研究所 発達生理学研究系 認知行動発達研究部門, ²総合研究大学院大学 生命科学研究所, ³科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業(CREST))

マカクザルの第一次視覚野を片側的に除去して作成した盲視実験モデルでは人での盲視現象と同様な行動を示すことが報告されている。本研究ではマカクザル盲視モデルに急速眼球運動を行動の指標とした視覚運動変換課題を行わせることで、切除の対側視野(「盲」視野)での視覚情報処理が(1)空間的注意によって影響を受けるか、(2)短期記憶を利用することができるか、について検証した。(1)手掛かり刺激を中心視野に提示した空間的注意課題を行わせた。その結果、手掛かり刺激によって「盲」視野に空間的注意を向けることで「盲」視野での視覚検出能力が向上することが示唆された。(2)記憶誘導性急速眼球運動課題を行わせた。その結果、盲視モデルサルが「盲」視野に提示された手掛かり刺激の位置を2秒間保持して、記憶した位置へ正しく急速眼球運動を行うことができることを見出した。これらのことは、第一次視覚野除去後の残存視覚経路が視覚誘導性急速眼球運動のような単純な視覚運動変換の遂行のみならず、空間的注意や短期記憶といったより高次な認知機能の発現にも十分な情報を伝達できることを示唆している。

P8. PKCの活性化によって起こるKCNQ/Mチャネルのコンダクタンス-電圧関係の脱分極側へのシフト

○中條浩一^{1,2}, 久保義弘^{1,2} (¹生理学研究所・神経機能素子研究部門, ²SORST, JST)

KCNQ/MチャンネルはG_qカップル受容体の活性化によって抑制を受ける。この抑制機構は主にPIP₂の減少によるものと考えられているが、同時に起こるPKCの活性化がチャンネルを抑制する機構も提案されている。今回、我々はKCNQチャンネルとM1ムスカリン性アセチルコリン受容体を共発現させることでアフリカツメガエル卵母細胞にM電流を再構成した。10 μMのoxo-MによってM1受容体を活性化させるとKCNQチャンネルのコンダクタンス-電圧関係(G-Vカーブ)が脱分極側にシフトした。またPKCのアクチベーターであるPMAを投与したところKCNQ2チャンネルのG-Vカーブは17.5mVシフトした。一方、10 μMのwortmanninによってPIP₂を減少させると、最大電流量は約5分の1に減少したものの、G-Vカーブにはほとんど影響を与えなかった。これらの結果により、G-Vカーブのシフトは主にPKCの活性化によるものであると考えられた。M電流抑制時において、PIP₂の減少がチャンネルの電位依存性を変化させずに電流量を減少させるのに対し、PKCはチャンネルの電位依存性を変化させることでチャンネルを抑制すると考えられる。

P9. 自発性Ca²⁺ transientの消失が小脳顆粒細胞の移動の終了を惹起する

○熊田竜郎^{1,2}, 小室 仁², 福田敦夫¹ (浜松医科大学・生理学第一,²Dept. of Neurosciences, The Cleveland Clinic)

新生児期の小脳の外顆粒層で最終分裂を終えた小脳顆粒細胞は、皮質層特異的に細胞移動の速度や様式、細胞形態を変化させながら移動し、最終目的地である内顆粒層に到達する。今回、我々はこの皮質層特異的な細胞移動の制御にCa²⁺シグナリングが関与する可能性を検討するために、新生児期のマウス小脳スライス標本を用いて、移動中の顆粒細胞の動きをリアルタイム観察することと同時に、その細胞での細胞内Ca²⁺イメージングを行った。その結果、1) 移動中の顆粒細胞は、各皮質層にある移動経路において特異的な自発性細胞内Ca²⁺レベルの変動を示す。2) Ca²⁺transientsの発生頻度は顆粒細胞の移動速度に正に相関する。3) ほとんどの顆粒細胞が移動を終了する内顆粒層深部では、細胞移動の終了に先行してCa²⁺transientの消失が起こる。4) 薬理的にCa²⁺シグナリングを変化させることにより細胞移動の停止のタイミングを変化させることができる、ことが明らかになった。以上のことから、自発性Ca²⁺transientが小脳顆粒細胞の移動を制御し、その消失により細胞移動の終了を惹起すること示唆された。

P10. 全反射蛍光顕微鏡を用いた血管内皮細胞からの組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) 開口放出現象のリアルタイム解析

○鈴木優子, 井原真人, 最上秀夫, 浦野哲盟 (浜松医科大学生理学第二)

【背景】血管内皮細胞は様々な生理活性物質を産生・分泌し血管機能を維持している。血管内線溶における主要な線溶酵素であるtPAは、活性型セリン酵素として分泌されるためその多寡が機能発現に直結するが分泌機構は明らかでない。我々は血管内皮細胞におけるtPA分泌動態をリアルタイム解析した。【方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞由来細胞株に緑色蛋白(GFP)融合tPAを発現させ、その蛍光強度の変化を全反射蛍光顕微鏡にて検討した。また培養上清中のtPAはfibrin autographyで解析した。【結果および考察】①tPA-GFPは細胞内で小顆粒中に存在し、非刺激下でも放出され上清中にPA inhibitor-1 (PAI-1)との複合体として存在した。②酸性環境下にある分泌顆粒中ではGFPの蛍光強度は弱く、顆粒の開口に伴うpHの上昇に伴い急激に蛍光強度が増強する。これに続く緩やかな蛍光強度減弱過程は、tPA-GFPの放出現象を示すと考えられた。③PAI-1により蛍光強度減弱時間は短縮し、上清中にfree tPAはなく、tPA-PAI-1が添加したPAI-1の濃度依存性に増加した。【結論】1. 細胞に発現させたtPA-GFPはその分泌過程を可視化する有効な手段である。2. 分泌顆粒開口後、tPA-GFPは緩徐に細胞外へ放出されるが、PAI-1はtPAと高分子複合体を形成することで液相中への移行を促進することが示唆された。

P11. ネコ大脳皮質第一次聴覚野ニューロンにおけるスパイク活動の興奮・抑制パターン

○佐藤 悠, 秦 嶺, 酒井雅史, 地本宗平 (山梨大学医学工学総合研究部・生理学第2)

純音刺激に対する興奮性スパイク活動の反応時間経過に基づき覚醒動物における第一次聴覚野ニューロンはphasic, pasic-tonic, tonicの3型に分類される。本実験では純音刺激に対する抑制性スパイク活動を時間・スペクトル-スパイク活動図を作ることにより調べた。結果：Phasic細胞では興奮と抑制は時間的に交代し、スペクトル的に共存した。これにより興奮性スパイク活動は狭い時間領域に局限するがスペクトル制限は設定されない。Tonic細胞では興奮と抑制はスペクトル的に交代し、時間的に共存した。これにより興奮性スパイク活動は狭いスペクトル領域に局限するが時間制限は設定されない。Phasic-tonic細胞では両者の混合した複雑なパターンを示した。結論：Phasic細胞は時間情報をスペクトル制限無しで分析する、

Tonic細胞はスペクトル情報を時間制限無しで分析する、Phasic-tonic細胞は時間的、スペクトル的に複雑な情報を分析する。シナプス入力 of 興奮と抑制のバランスシフトが時間的にPhasic細胞で生じ、スペクトル的にTonic細胞で生じ、時間・スペクトル混合的にphasic-tonic細胞で生じることが示唆された。

P12. 覚醒ネコ一次聴覚野ニューロンの複合音スペクトラル包絡に対する選択的応答

○地本宗平, 秦 嶺, 酒井雅史, 佐藤 悠 (山梨大学医学工学総合研究部・生理学第2)

心理物理学の実験から、母音の認知にはスペクトラル包絡が重要であり、フォルマントの鋭さが母音認知に関与することが示されている。しかしながら大脳皮質のニューロンがスペクトラル包絡をどのように処理しているかは明らかではない。本実験では覚醒ネコの大脳皮質一次聴覚野(AI)において、異なるスペクトラル包絡をもつ複合音刺激に対するニューロン応答を調べた。スペクトラル包絡(上向き凸型)のピーク周波数を常にニューロンの最適周波数に固定し、その周辺スペクトラルの相対振幅を系統的に変化させてその包絡の尖鋭度を変化させた。周波数応答野の興奮野と抑制野を規定するために純音と2音刺激に対する反応を用いた。異なる相対振幅を持つ刺激に対するニューロン応答について、刺激スペクトラルと周波数応答野の対応と合わせて解析した。AIニューロンは、音のエネルギーが抑制野を部分的に含む周波数応答野上にある場合はより尖鋭度が高い刺激に対して選択性を示し、抑制野をほとんど含まない周波数応答野上にある場合はより尖鋭度が低い刺激に対して選択性を示した。このことは、一次聴覚野はスペクトラル包絡が同じピーク周波数を持つ場合その尖鋭度を区別でき、その選択性はスペクトラル上の興奮と抑制のバランスの変化に起因することを示唆している。また本結果は母音認知がAIにおいてスペクトラル包絡の手がかりを解析されることにより行われているという仮説を支持する。

P14. ダイオキシンへの周産期曝露は雄ラットの文脈恐怖条件付け後の海馬CA1領域におけるcyclic AMP response element-binding proteinのリン酸化を抑制する

○三井哲雄¹, 前田秀一郎¹, 有田 順² (山梨大・院・医工・生理¹, 生化¹)

ダイオキシン類、中でも2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)への周産期曝露が、子供の成熟後の記憶、学習行動へ及ぼす影響が懸念されている。本実験は妊娠ラットにTCDDを投与し、仔の成熟後に海馬依存性学習行動への影響をcontextual fear conditioning test (CFCT)

を用いて検討した。この結果、TCDD投与群の雄は非投与群の雄に対して有意にfreezing時間が減少した。CFCTには雌雄差があり、これは海馬におけるCREBのリン酸化による活性化が関与することが示唆されている。そこでさらに、免疫組織化学的方法により、海馬のCREBリン酸化について調べた結果、海馬CA1領域において、TCDD投与群の雄のCREBのリン酸化細胞の割合が、非投与群の雄に対して有意に減少していた。雌ではTCDD投与群と非投与群との間に有意な差は見られなかった。この結果からTCDD曝露による雄の学習能力の低下には、海馬CA1領域のCREBリン酸化の抑制が関与している可能性が示唆された。

P15. マルチユニット弁別システムの開発と交感神経プレモーターニューロン記録への応用

○三枝岳志, 有田 順 (山梨大学大学院 医学工学総合研究部・生理学1)

データ表示・解析ソフトウェアであるIgor Pro^(TM) (WaveMetrics社)を用いて、汎用のデータ取得装置にマルチユニット弁別機能を追加するシステムを開発した。ハードウェアに変更を加えることなく既存のデータ取得装置を利用できること、ユニット弁別に用いるパラメータを容易に追加・修正できること、準リアルタイム(1秒以内の遅れ)の解析が連続して行えることを目標とした。ユニット弁別は、閾値を越えたスパイク状波形に対して、山の高さ、山の前後の谷の深さ、山から谷までの振幅、時間、傾きなどの波形パラメータを用いて行った。これらのパラメータは任意の組み合わせで散布グラフ上に表示され、各ユニットを視覚的に分離できるようにした。また、各グラフごとに設定可能な境界線の数も無制限とした。ウレタン麻酔自発呼吸下の家兎を用い、吻側延髄腹外側野血圧感受性ニューロンの活動を記録して本システムの有用性を検証した。その結果、従来のウィンドウ弁別器では分離困難である信号対雑音比の低い信号の識別、およびマルチユニットの弁別に有用であることが確認された。今後は、本システムの柔軟性を生かし、より弁別能の高いパラメータの設定およびマルチ電極への対応を検討する予定である。

P16. ブラジキニンおよびATPによるTRPV1の感作機構におけるzaltoprofenの効果の検討

○杉本憲治, 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)

TRPV1は後根神経節などにある一次神経に発現しており刺激時ナトリウムおよびカルシウムイオンを流入させ膜の脱分極を起こし、中枢に痛みを伝達する侵害受容器の1

つである。炎症時に痛みの認知が増強する理由の1つとして、痛み惹起物質として知られるブラジキニンおよびATPによるTRPV1の感作が考えられている。Zaltoprofenは非ステロイド系消炎鎮痛剤であるが炎症性疼痛、特にブラジキニン誘発性疼痛に対し高い効果が認められる。今回その効果の機序を解明するべくブラジキニンおよびATPによるTRPV1の感作に対する抑制効果につき検討した。発現ベクターを用いてHEK293細胞にTRPV1およびB2Rを強制発現させ、パッチクランプ法にてTRPV1を流れる電流を測定した。ブラジキニンによるカプサイシン刺激後のTRPV1電流の増加はZaltoprofenにより完全に抑制された。さらにATPによるTRPV1の温度閾値の低下もZaltoprofenにより抑制された。よってZaltoprofenのTRPV1の感作に対する抑制効果はブラジキニンおよびATPに共通の細胞内シグナル分子を介している可能性が示唆された。

P17. ラットにおける遅発性筋痛に対するZaltoprofenおよびCelecoxibの効果

○寺澤悦司, 田口 徹, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所・神経調節分野)

ラットの長指伸筋に対して伸張性収縮 (ECC) を負荷することにより遅発性筋痛 (DOMS) のモデルを作成した。このモデルにおいて、2種の消炎鎮痛薬Zaltoprofen (Z), Celecoxib (C) の筋肉痛に対する効果を検討した。

【対象および方法】雄SDラットを用い、圧痛閾値はRandall-Selitto (RS) 式鎮痛効果測定装置と、von Frey hair (VFH) を用いて測定した。ECCはネンプター麻酔下で行った。ZおよびC群は①ECC開始1時間前に10mg/kg経口投与し、2日後に溶剤を投与する群と、②ECC当日は溶剤、2日後の測定1時間前に10mg/kg経口投与する2群に分けた。さらに、コントロールとして2回とも蒸留水投与する群を設定した。【結果】コントロール群ではRS法によって測定した圧痛閾値が2日目に有意に低下した。ZおよびCをECC前に投与した群のみがECCの効果を抑制した。VFHで測定した皮膚圧痛閾値はいずれの群においても差を認めなかった。【まとめ】ECC負荷前に投与した場合にはECCによる筋痛覚過敏の発現を抑制した。プロスタグランジンがDOMSの発現には関与しているが、その維持には関与していないことが示唆された。

P18. 培養大脳皮質神経細胞における興奮性シナプスの活動依存的な発達

○高田直樹¹, 柳川右千夫², 小松由紀夫¹ (¹名古屋大学・環境医学研究所, ²群馬大学大学院・医学系研究科)

神経活動は発達期大脳皮質のシナプス成熟に重要な役割を持つ。我々は単純な孤立細胞培養系を用いて、発火活動レベルの変化が興奮性シナプスの形成や成熟にどのような影響を与えるかについて調べた。通常の孤立興奮性神経細胞では、発達に伴って興奮性後シナプス電流 (EPSC) は大きくなり、頻回刺激などによる短期シナプス抑圧の程度は小さくなった。これに対して、TTXを培養液に慢性投与した細胞では、発達に伴うEPSCの増大は抑制され、短期シナプス抑圧の程度は増大した。このような活動依存的なシナプス反応の違いについてさらに検討するためシナプス数を見積もったところ、TTX投与群では総シナプス数が有意に減少していた。微小EPSCの大きさは両群において差はなかった。また、MK-801を用いて伝達物質放出確率を見積もったところ、TTX投与シナプスの放出確率は有意に高くなっていった。これらのことから、活動レベルの違いによるEPSCの大きさの変化は主にシナプス数の違いによるものと考えられ、短期シナプス抑圧の変化は主に放出確率の違いによるものと考えられる。生体内においても発達期の興奮性シナプスは様々な発火活動レベルによって影響を受ける可能性が示唆された。

P19. 大脳皮質視覚野抑制性伝達に生じる睡眠—覚醒状態依存型長期増強および長期抑圧

○黒谷 亨, 稲垣 壮, 山田和政*, 小松由紀夫 (名古屋大学・環境医学研究所・視覚神経科学, *星城大学・リハビリテーション学部・理学療法専攻)

我々は、大脳皮質5層錐体細胞を高頻度発火させると、その細胞に入力する抑制性伝達に長期増強、および長期抑圧が生じることを報告した。しかし、両者の生理的意義は必ずしも明確でなかった。そこで今回は、睡眠、覚醒状態において錐体細胞に観測される膜電位変動が、錐体細胞の細胞体に入力する抑制性伝達にどのような効果を及ぼすかを調べた。

徐波睡眠時には、錐体細胞の膜電位は -70mV 程度の静止膜電位を中心に 1Hz 以下の低周波で振動している。これを模した 0.5Hz 、振幅 40mV の膜電位振動をcurrent clampモードで10分間錐体細胞に与えたところ、細胞体部のIPSCに長期増強が生じた。また覚醒時には、錐体細胞の膜電位はやや脱分極 (-60mV 程度) し、連続的に発火した状態にある。この状態を模した膜電位変動をcurrent clampモードで3分間錐体細胞に与えると、細胞体部のIPSCに長期抑圧が生じた。従って、錐体細胞の興奮性は徐波睡眠時には低下し、覚醒時には増大すると考えられる。このメカニズムは、徐波睡眠時に大脳からの出力を低下させ、覚醒時に増大させる制御機構となり得る。