

## 第53回中部日本生理学会

日 時：平成18年9月27日（水）、28日（木）

会 場：山梨大学甲府キャンパス

当番幹事：山梨大学大学院医学工学総合研究部生理学講座

有田 順, 佐藤 悠

60名を超える参加者のもとに、27日10時30分開会から、28日12時30分閉会までの期間に合計34題の口演が発表されました。前回と同様に、若手研究者の口演発表技術の向上のために15分の口演時間を設け、また、助手クラスの研究者に座長の経験もしていただきました。研究分野が多岐に亘ったにもかかわらず、質疑応答が活発に行われましたこと、参加者皆様に厚くお礼申し上げます。来年度は三重大学大学院医学系研究科神経感覚医学講座システム神経科学山本哲朗教授およびゲノム再生医学講座再生統御医学山崎英俊教授の当番幹事によって、第54回中部日本生理学会と第100回近畿生理談話会が共同開催されることになりました。

## 1. CLC-5と胃プロトンポンプの分子会合

○高橋佑司<sup>1</sup>、大平裕太<sup>1</sup>、田淵圭章<sup>2</sup>、五十里 彰<sup>3</sup>、坂本尚登<sup>4</sup>、内藤一郎<sup>5</sup>、真鍋康二<sup>5</sup>、内田信一<sup>6</sup>、佐々木 成<sup>6</sup>、浅野真司<sup>7</sup>、森井孫俊<sup>1</sup>、竹口紀晃<sup>1</sup>、酒井秀紀<sup>1</sup>（<sup>1</sup>富山大・院医薬・薬物生理、<sup>2</sup>富山大・生命研セ、<sup>3</sup>静岡県立大・薬、<sup>4</sup>北里大・医、<sup>5</sup>重井医学研、<sup>6</sup>東京医歯大・院、<sup>7</sup>立命館大・情報理工）

【目的】胃酸（HCl）のH<sup>+</sup>は胃プロトンポンプによって分泌されるが、Cl<sup>-</sup>分泌を担う分子実体はわかっておらず、胃酸分泌機構の詳細は未解明である。我々はCLC-5が胃酸分泌細胞に発現していることを見出した。本研究では、CLC-5と胃プロトンポンプの機能連関を免疫沈降法、及びK<sup>+</sup>依存性ATPase活性測定により検討した。

【方法】CLC-5 Tet-on systemにおいて、テトラサイクリン処理（Tet-on）によりCLC-5の発現を誘導し、その後、細胞膜画分を調製した。可溶化した細胞膜画分を用いて、抗胃プロトンポンプ抗体、抗ナトリウムポンプ抗体で免疫沈降し、各タンパク質をウェスタンブロット法で検出した。胃プロトンポンプ活性及びナトリウムポンプ活性は、特異的阻害剤であるSCH 28080（50μM）及びウアバイン（5μM）で阻害される成分として算出した。

【結果、考察】CLC-5 Tet-on systemを用いた免疫沈降の結果、胃プロトンポンプのinputとimmunoprecipitateの割合（免疫沈降率）は101.7±27.6%（n=3）であった。この条件下で、CLC-5は胃プロトンポンプと免疫共沈降することがわかり、CLC-5の免疫沈降率は90.8±11.0%（n=3）であることから、胃プロトンポンプとCLC-5は分子会合していることが示された。一方、内因性ナトリウムポンプの

免疫沈降率は79.8±25.8%（n=3）であったが、CLC-5は免疫共沈降されなかった。CLC-5 Tet-on systemにおいて、CLC-5発現（Tet-on）は胃プロトンポンプ活性を有意に上昇させたが（30.9±2.5%、p<0.01（n=6））、ナトリウムポンプ活性には影響を与えなかった（n=6）。胃プロトンポンプ及びナトリウムポンプの膜画分での発現量はCLC-5の発現によって変化しなかった。以上の結果より、CLC-5は胃酸分泌細胞の分泌側膜において、胃プロトンポンプの活性調節因子として機能しているものと考えられる。

## 2. KCC3aによるNa, K-ATPase活性調節機構の解明

○藤井拓人、糸見安生、高橋佑司、森井孫俊、竹口紀晃、酒井秀紀（富山大学・大学院・薬物生理学）

K-Cl共輸送体（KCC）の胃における発現や機能はこれまで不明であった。我々は、ラット、マウス、ヒト胃粘膜およびウサギの胃酸分泌細胞にKCC3a蛋白質が発現していること、免疫組織染色によりKCC3aが胃酸分泌細胞の基底側膜に高発現していることを明らかにした。興味深いことにKCC3aは、酸分泌能の高い胃腺頸部の胃酸分泌細胞に高発現していた。

LLC-PK1細胞において、テトラサイクリンによりKCC3aの安定発現を誘導できるT-RExシステムを構築した。KCC3aの発現誘導によって、Na, K-ATPaseの発現量は変化しないにもかかわらず、ウアバイン感受性のNa, K-ATPaseの酵素活性が34.0±3.2%上昇した。また、ATP依存性のリン酸化レベルを測定した結果、KCC3a発現細胞ではEP生成量が44.7±9.6%上昇した。種々の条件でKCC3aとNa, K-ATPaseとの免疫沈降を行ったが、会合を

示す結果は得られなかった。以上の結果より、基底側膜の KCC3a は Na, K-ATPase の EP レベルの増大を介して酵素活性を上昇させるものと考えられた。また、KCC の阻害剤 DIOA は、P 型 ATPase の酵素活性を阻害するという知見を得た。

### 3. 胃高分化型腺癌組織におけるアクアポリン 5 の異常発現

○渡邊智子<sup>1</sup>, 堀川直樹<sup>1</sup>, 塚田一博<sup>1</sup>, 藤井拓人<sup>2</sup>, 酒井秀紀<sup>2</sup> (富山大学医学部第二外科, <sup>1</sup>富山大学大学院 薬物生理学研究室)

アクアポリン (AQP) は AQP0~12 の 13 種類の isoform がある。ヒト胃正常粘膜組織では AQP1, 3, 4, 5 の発現が確認されており、胃酸分泌腺に AQP4, 幽門腺に AQP5 が強発現している。本研究では AQP の胃癌における発現変化を検討した。

実験には 2005 年 6 月より 2006 年 8 月の間、本学附属病院で胃切除術を施行した患者の胃癌及び胃正常粘膜組織 (上・中・下部領域) を用いた。

結果、胃上部領域の正常粘膜では発現しない AQP5 が、同領域の癌組織に発現していた。AQP4 は癌組織では殆ど発現せず、AQP3 は正常粘膜、癌組織共発現を認めなかった。癌組織での AQP5 の発現は組織型による差が顕著で、高分化型では 10 例中 8 例で AQP5 の発現増加が認められたのに対し、低分化型では 4 例全例で発現増加を認めなかった。免疫組織染色で AQP5 は、幽門腺では腺底部にのみ発現するが、高分化型腺癌では腫瘍の腺管内腔 apical 側を全て覆う様に発現していた。

大腸癌、卵巣癌でも AQP5 の異常発現が確認されているが、その生理機能は未解明である。胃癌では高分化型腺癌に発現することから、癌組織の管状構造維持、発育形態、転移様式等に関与する可能性が考えられる。

### 4. ヒト非胃型 H, K-ATPase の ouabain binding に関するアミノ酸残基の同定

○大平裕太, 森井孫俊, 高橋佑司, 竹口紀晃, 酒井秀紀 (富山大学 大学院 薬物生理学研究室)

Na, K-ATPase の特異的阻害剤である ouabain は、ヒト非胃型 H, K-ATPase (ATP1A1) に対して弱いながらも阻害作用を持つ。Na, K-ATPase の ouabain binding site については、近年明らかになりつつある。我々は、ATP1A1 の ouabain binding site の詳細について検討した。

ATP1A1 の M3-M4 の細胞外ループのアミノ酸残基を Na, K-ATPase に対応するアミノ酸残基に置換した変異体 EV (D334E/I336V), EAV (D334E/S335A/I336V), TEAV

(Q331T/D334E/S335A/I336V), T (Q331T) を作成し、胃 H, K-ATPase  $\beta$ -subunit を安定に発現させた HEK293 細胞に ATP1A1 の野生型 (WT), 変異体を一過性に発現させた。これらの細胞より調製した膜画分の ATPase 活性に対する ouabain の濃度依存的 (0-3mM) な阻害効果を測定した。

HEK293 細胞の内因的な Na, K-ATPase は低濃度 (10  $\mu$ M) の ouabain ではほぼ完全に阻害されるが、ATP1A1 WT は高濃度 (100 $\mu$ M 以上) で阻害を受けた。100 $\mu$ M 以上の ouabain で阻害される ATPase 活性の成分を ATP1A1 活性として、ATP1A1 への変異導入が、ouabain 感受性に与える影響を検討した。その結果、TEAV においてのみ、高濃度の ouabain で阻害される ATPase 活性成分が消失した。Ouabain 分子の docking では、TEAV が最も binding site の奥で安定に結合することができる変異体であるという結果を得た。以上のことから ATP1A1 の Na, K-ATPase に比べて低い ouabain 感受性に Gln-331 と、Asp-334, Ser-335, Ile-336 が関与している可能性が考えられた。

### 5. モルモット胃幽門部輪走平滑筋の自発活動に及ぼす低酸素の影響

○中村江里, 鈴木 光 (名古屋市立大学大学院 細胞機能制御学)

モルモット胃幽門部から摘出した平滑筋組織を用いて、低酸素環境 (酸素分圧を 1/3 に低下) による平滑筋組織の活動変化を、筋の等尺性張力、細胞内電位、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化などを指標にして調べた。低酸素環境にすると平滑筋の律動的自動収縮張力は減少し頻度は増加した。この組織ではカハールの介在細胞 (ICC-MY) が平滑筋自動運動の歩調とりを担っているため、収縮頻度の増加は ICC-MY の反応、収縮張力の低下は平滑筋細胞の反応であろうと考えた。低酸素にすると平滑筋細胞の静止膜電位や slow wave の振幅は変化せず、slow wave の頻度だけ増加した。また低酸素環境では細胞内 Ca<sup>2+</sup> 振動の振幅が減少し、頻度が増加した。CCCP (ミトコンドリア内膜のプロトノフォア) は低酸素による自動収縮の振幅減少作用を僅かに増強した。CPA (細胞内 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 抑制薬) は低酸素による自動収縮の振幅減少作用及び頻度増加作用を抑制した。以上の結果から低酸素環境にすると ICC-MY はおもに小胞体 ER の Ca ポンプを介して興奮頻度を増加させ、平滑筋細胞は筋小胞体 SR の Ca ポンプ作用を介して Ca<sup>2+</sup> の取込が促進し、細胞質の Ca<sup>2+</sup> 濃度が低下し、その結果として収縮張力が減少することが示唆された。

## 6. G1/S 期細胞周期抑制剤によるニューロンへの分化誘導

○三角吉代, 飛田秀樹, 金 へ亭, 西野仁雄 (名古屋大学大学院・医学研究科・脳神経生理学)

幹細胞を用いた再生医療が注目されているが, 自己再生能力を有する未分化な神経幹細胞からの神経新生において, 細胞周期と神経分化の関連性についてのメカニズムは十分に明らかになっていない。我々は, ラット胎仔 (E12.5) 中脳由来の神経幹細胞 (NPCs) に deferoxamine (DFO) 等の G1/S 期細胞周期抑制剤を処理すると, NPCs のニューロン分化が促進される事を報告した。本研究は, G1/S 期細胞周期抑制剤によるニューロン分化促進メカニズムを調べることを目的とした。ラット中脳由来の NPCs を, DFO で 8 時間処理した後に 1% 血清の存在下で 3 日間分化誘導を行うと,  $\beta$ -tubulin III 陽性の神経細胞が約 2 倍に増加した。この時, DFO 処置群では p27<sup>kip1</sup> mRNA の発現が高く維持され, その後 neuroD promoter 活性が上昇した。また, p27<sup>kip1</sup> との作用が報告されている cdk5 mRNA の発現は, DFO 処置中にコントロール群に比べて減少していたが, 分化一日目には反対に増加していた。これらの結果から, p27<sup>kip1</sup> 増加とその発現以前に認められる cdk5 の発現変化が, DFO 処置後の神経分化に関与していることが明らかになった。

## 7. サイトカインによる ES 細胞由来神経幹細胞からドーパミンニューロンへの分化促進作用

○金 泰善, 飛田秀樹, 三角吉代, 西野仁雄 (名古屋大学大学院・医学研究科・脳神経生理)

DA 入力が欠乏した線条体において, 栄養因子や IL-1 $\beta$ , LIF, IL-11 等のサイトカインの発現が増加していた。本研究は, 栄養因子とサイトカインの処置により, ES 細胞由来幹細胞の DA ニューロンへの分化誘導が促進されるかどうか, その分化機構について解析することを目的とした。McKay らの 5 段階の分化方法を用いて Nestin 陽性神経幹細胞の増殖期にサイトカインカクテル (IL-1 $\beta$ , LIF, IL-11, GDNF) を処置し, 神経分化後の TH 陽性の DA ニューロンの数を調べた。

サイトカインカクテルの処置により, DA ニューロン数は 2.11 倍になった。IL-1 $\beta$  及び LIF の単独処置により, 同様な効果が認められた。しかし, DA ニューロン数が増加する 3.5% の低酸素条件下と組み合わせても, その相加・相乗効果はなかった。HIF-1 $\alpha$  蛋白の発現量は, サイトカインカクテル処置群で増加していた。以上のことから, ES 細胞由来神経幹細胞へのサイトカインカクテルの処置によって DA ニューロンの分化が促進され, その分化促進作用は, HIF-

1 $\alpha$  の発現増加が関係することが示唆された。

## 8. ラット小脳分化過程における興奮性 GABA 作用

○森島寿貴<sup>1</sup>, 福田敦夫<sup>2</sup>, 吉田祥子<sup>1</sup> (<sup>1</sup>豊橋技術科学大学, 松医科大学)

発生初期に興奮性に働く GABA は小脳分化と発達に大きく関与しているものと考えられる。

そこで我々は酵素反応を用いたグルタミン酸のイメージング法により, GABA 投与により外顆粒層で顆粒細胞からのグルタミン酸放出量が変化するかを観察した。

その結果, 発生初期には自発的に放出されるグルタミン酸濃度が高いことが観察され, 顆粒細胞移動期にスライスへの GABA 投与を行うと外顆粒層でグルタミン酸放出量の増加が観察された。

さらにこのような興奮性, グルタミン酸の放出誘導性作用の GABA が自発的に, ラット小脳分化過程でどのように放出されているのかを確かめるため, 酵素反応を利用した GABA のイメージング法を開発し, 経時的な GABA 放出の空間分布とその放出量の変化を観察した。自発的 GABA 放出は, 外顆粒層およびプルキンエ細胞層で発生直後から顆粒細胞移動期にかけて, 成熟後に比べて高濃度の GABA が放出されており, 顆粒細胞移動が完成する時期には成熟後の GABA 放出量にまで減少した。

以上の結果から顆粒細胞移動期に外顆粒層で放出されている GABA は興奮性に作用することで, 顆粒細胞からのグルタミン酸放出を誘導し, 小脳ニューロンの分化や細胞移動に関与することが示唆された。

## 9. 大脳皮質移動細胞の GABA<sub>A</sub> 受容体を介する細胞外の GABA と Taurine の影響

○古川智範<sup>1</sup>, 山田順子<sup>2</sup>, 井上浩一<sup>1</sup>, 柳川右千夫<sup>3</sup>, 福田敦夫<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>浜松医大 生理学第一, <sup>2</sup>静大 院 電子科研, <sup>3</sup>群馬大 院 脳神経発達統御学)

発達期大脳皮質において, 脳室帯で発生した神経細胞は放射方向に移動する。この細胞移動には GABA<sub>A</sub> 受容体の機能が関与している。本研究では GABA 含有量が減少している GAD67-GFP ノックインマウスを用い, *in vivo* で細胞周囲の GABA とタウリンが発達中の移動細胞に及ぼす影響を調べた。

胎仔 (E14) の移動細胞を赤色蛍光タンパク (HcRed) で標識し, 3 日後に細胞外 GABA の細胞移動に対する影響を調べた。ホモ変異型マウスにおいても細胞移動は正常であった。また, 移動細胞の GABA<sub>A</sub> 受容体を介する GABA 応答性にも細胞外の GABA の影響は見られなかった。タウリン合成酵素阻害剤である D-cysteinesulfinate を母体腹腔内

へ投与し、細胞移動に対するタウリンの影響を検討した。D-cysteinesulfinate を母体に投与したマウスでは、GABA とタウリンは共に減少しており、皮質板に分布する移動細胞の割合が有意に増加していたことから、発達期大脳皮質において、細胞外に存在する GABA とタウリンは GABA<sub>A</sub> 受容体に作用し、協調的に放射方向への細胞移動を制限していると考えられる。

## 10. 表皮に発現する温度感受性 TRP チャンネルから感覚神経への温度情報の伝達機構

○Mandadi Sravan<sup>1</sup>, 福見-富永知子<sup>12</sup>, 柴崎貢志<sup>12</sup>, 曾我部隆彰<sup>1</sup>, 鈴木 誠<sup>3</sup>, 水野敦子<sup>3</sup>, 富永真琴<sup>12</sup> (1岡崎統合バイオ・細胞生理, <sup>2</sup>総研大・生命科学, <sup>3</sup>自治医大・薬理)

温度感受性 TRP チャンネル TRPV3, TRPV4 は表皮ケラチノサイトに発現して体温近傍の温度を受容している。TRPV3, TRPV4 で感知された温度情報が感覚神経に伝達されるために神経伝達物質のような拡散性分子が存在すると仮定し、その分子の同定を試みた。まず、マウスケラチノサイトと感覚神経細胞の共培養系を確立し、温度刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 体濃度の増加が先ずケラチノサイト、続いて感覚神経細胞で起こることを確認した。次に、マウスのケラチノサイトと各種イオンチャネル型受容体 (P2X<sub>2</sub> 受容体, 5-HT<sub>3</sub> 受容体, NMDA 受容体) を発現させた HEK293 細胞を共培養し、パッチクランプした HEK293 細胞をケラチノサイトに近づけた。ケラチノサイトを温度刺激したときの各バイオフィンセンサーによる電流の発生を指標にしてケラチノサイトから放出される物質の同定を試みた。さらに、ケラチノサイトにおける温度受容に TRPV3, TRPV4 どちらがより強く関与しているかを TRPV3 欠損マウス, TRPV4 欠損マウスのケラチノサイトを用いて検証した。

## 11. 体温維持が海馬神経活動に与える影響：TRPV4 による膜電位の制御

○柴崎貢志<sup>12</sup>, 鈴木 誠<sup>3</sup>, 水野敦子<sup>3</sup>, 富永真琴<sup>12</sup> (1岡崎統合バイオサイエンスセンター・細胞生理部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学・生命科学研究科, <sup>3</sup>自治医科大学・薬理学講座)

TRPV4 は体温程度の温度により活性化される温度センサーである。我々は脳における TRPV4 の発現と機能に着目した。成体マウス脳内の TRPV4 mRNA 発現分布を調べた結果、既に発現が報告されている脈絡叢の他に、海馬に強い発現が認められた。TRPV4 蛋白質は細胞体・樹状突起に局在し、さらに海馬神経細胞に機能的に発現していることが確認された。このため、TRPV4 は体温で活性化され、カチオンの流入により膜電位を脱分極側にシフトさせ

ている可能性が考えられた。これらの仮説を検証するために、野生型マウスと TRPV4 欠損マウスより、海馬初代神経細胞を調整し、静止膜電位を定量的に比較した。その結果、野生型の海馬初代神経細胞では、TRPV4 欠損型の細胞と比較し約 5mV 程度静止膜電位が脱分極していることが確認された。また、電流注入実験を行った結果、TRPV4 欠損型の海馬神経細胞では野生型の細胞よりも発火が起りにくいことが確認された。以上の結果より、温度受容体 TRPV4 は我々の体温で活性化しており、神経細胞が興奮しやすい土台の環境を産み出す重要な役割を担っていることが明らかとなった。TRPV4 は体温情報を介して海馬神経細胞の膜興奮性の制御を担う重要な因子であると考察される。

## 12. 低温環境への曝露が慢性痛モデルラットの心循環パラメータに及ぼす影響

余 錦, ○佐藤 純, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所)

慢性痛のメカニズムにおける自律神経の役割を調べるため、神経損傷後疼痛ラットに低温曝露を罹病期間中に繰り返し行い、心循環パラメータの反応性から自律神経系の変動をみた。坐骨神経損傷 (CCI) を行った SD ラットから自由行動下にテレメトリー記録した動脈圧波形から平均血圧 (MAP), 心拍数 (HR), 心拍間隔変動周波数パワーを求めた。安静時 MAP は術後 4-19 日目に上昇した。安静時 HR は術後 4 日目に上昇後は徐々に低下し 19 日目には低値を示した。心拍間隔変動パワースペクトルのうち副交感神経活動を反映する高周波成分 (HF) は術後 11 日目以後に高値を示した。一方、交感神経活動を反映する低周波成分 (LF)/HF 比は MAP と同様の経日変化を示した。術後 4~19 日目の低温曝露 (22°C より 7°C 冷却) により MAP, HR は上昇したが、その程度は術前のものと変わらなかった。LF/HF は術後 4, 7 日目以外で上昇した。HF は術後 11 日目以後に低下した。以上より、1) CCI 術後早期には交感神経が、2 週目後半には副交感神経が優位になる、2) 交感神経に対する低温曝露の効果は健常時~疼痛罹病期を通じて同様である、3) 術後 11 日目以後では低温曝露は副交感神経を抑制することが分かった。

## 13. 伸張性収縮負荷 (LC) による筋痛覚過敏に対する繰り返し寒冷ストレス (RCS) の影響

○那須輝顕, 田口 徹, 佐藤 純, 水村和枝 (名古屋大学環境医学研究所)

過去に臨床的に重要な慢性のモデル動物は報告が無く、慢性筋性疼痛の神経機構については未解明な点が多い。今

回我々はRCSの5日間負荷による痛覚過敏の観察と、RCSにLCを先行させた時に深部(筋)痛覚過敏が延長するかどうかを検討した。その結果RCS負荷群では両側の長指伸筋筋腹上の皮膚の圧痛閾値(von Frey法)はRCS負荷後56日間変化しなかったが、RCS+LC負荷群では、両側に10日間にわたり低下が見られた。深部圧痛閾値(Randall-Selitto法)は、RCS負荷群では両側において21日目まで有意に低下し、RCS+LC負荷群では35日目まで、かつ両側に低下が観察された。そしてEMLAクリームによる、表面麻酔によりvon Frey法で測定した痛覚閾値は上昇するのに対し、Randall-Selitto法のそれは不変であったことから、Randall-Selitto法による測定値は、深部組織の痛覚閾値を反映している事が示唆された。今回の結果よりRCS負荷にLCを先行させることにより両側の深部(おそらく筋)痛覚過敏をRCS単独負荷よりも長期に引き起こせることが明らかになった。

#### 14. 低亜鉛食飼育ラットにおける食塩嗜好の亢進とその原因

○魁谷嘉一<sup>3</sup>、畷 哲崇<sup>1</sup>、勝川秀夫<sup>1</sup>、中島清人<sup>2</sup>、山本宏治<sup>3</sup>、杉村忠敬<sup>1</sup>(<sup>1</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座口腔生理学分野、<sup>2</sup>朝日大学歯学部化学、<sup>3</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野)

ラットを低亜鉛飼料下で飼育すると高濃度食塩に対する嗜好を亢進させる。本研究ではこの原因を探るために、低亜鉛飼料下(欠乏群)または正常飼料下(正常群)で離乳期より5週間飼育したラットに対して、行動学的、電気生理学および内分泌学的実験を行った。その結果、48時間の二瓶選択法(対蒸留水)では、欠乏群が正常群より有意に0.1Mおよび0.3M食塩水を嗜好したが、10分間ではその差は有意ではなかった。味覚神経(鼓索神経および舌咽神経)を両側に切断した動物であっても、低亜鉛飼料下におくと48時間二瓶選択法で、食塩嗜好を亢進させた。4種基本味溶液および各種塩溶液に対する鼓索神経応答は欠乏群と正常群で有意差がなかった。血中ナトリウム濃度は、欠乏群と正常群間で有意差はなかったものの、前者の分散は後者のものより有意に大きかった。また、血中アルドステロン濃度は、前者が後者より有意に大きかった。以上の結果から、亜鉛欠乏ラットにおける食塩高嗜好には、味覚情報はほとんど関与しておらず、ナトリウムの代謝系に原因のある可能性が示唆された。

#### 15. 視床下部オレキシンAが骨格筋でのグルコース代謝に及ぼす影響

○志内哲也、岡本土毅、鈴木 敦、李 順姫、戸田知得、

齊藤久美子、箕越靖彦(生理学研究所、生殖・内分泌系発達機構研究部門)

骨格筋などの末梢組織でのグルコースの取り込みに及ぼす視床下部オレキシンの影響を検討した。オレキシンAを視床下部腹内側核(VMH)に投与すると、全身のグルコース代謝が亢進した。また、血中インスリンレベルに影響を与えずに骨格筋のみ有意にグルコース取り込みが上昇したが、これらの変化は視床下部室傍核や外側核にオレキシンAを投与した場合は見られなかった。摂食量および自発運動量には有意な変化はなかったが、骨格筋におけるノルアドレナリン代謝回転の亢進が確認できた。オレキシンAによる骨格筋のグルコース取り込み促進作用は交換神経節遮断薬であるグアナネジンの前処置により低下した。また、アドレナリンβ受容体阻害薬を前投与した場合も、オレキシンAによる骨格筋のグルコース取り込み増加作用が減弱した。さらに、オレキシンタイプ1受容体拮抗薬(SB334867)を両側のVMHに投与すると耐糖能が悪くなり、オレキシンAのVMH投与による骨格筋グルコース取り込み促進効果も減弱した。以上の結果は、オレキシンAが視床下部のVMHに作用して交感神経系を活性化することで、骨格筋のβ受容体を介してグルコースの取り込みを促進することを示唆する。

#### 16. ギプス固定による慢性痛症モデル動物の自律神経機能は?~血圧変動の周波数解析から~

○吉本隆彦<sup>1,2</sup>、江口国博<sup>1,3</sup>、櫻井博紀<sup>1</sup>、大道裕介<sup>1</sup>、橋本辰幸<sup>1</sup>、高畑成雄<sup>1,4</sup>、森本温子<sup>1,2</sup>、山口佳子<sup>1</sup>、熊澤孝朗<sup>1</sup>(<sup>1</sup>愛知医大・医・痛み学、<sup>2</sup>名古屋大・院・医・リハ、<sup>3</sup>愛知学院大・歯・生理、<sup>4</sup>札医大・院・医・整形)

慢性痛症患者では交感神経系の異常を伴う場合が多い。そこで、我々はギプス固定による慢性痛症モデル動物の自律神経機能を安静時、冷環境曝露時について血圧変動(テレメトリーシステムによる血圧記録)の周波数解析より得られる低周波成分(LF)を用いて10数週にわたり検討した。

まず、自律神経遮断薬を用いてLFがα系交感神経活動の指標として有用であることを確認した。

本モデル動物において、安静時血圧はギプス固定中に上昇し、固定除去後1週にかけて低下し、それ以後処置前と比較してさらに低下した。またLFは血圧の変動と有意な相関を示した。冷環境曝露に対する血圧上昇反応は固定除去後から高かったが、各例でのLFとの相関ははっきりしなかった。

本慢性痛症モデル動物では安静時においてギプス固定中に交感神経(α系)の過活動を示したが、固定除去後の痛み

行動慢性期にはその活動がかえって低下していることが考えられた。また、病態時には刺激に対する血圧上昇反応は増大するが、その上昇には $\alpha$ 系交感神経活動以外の因子の関与が示唆された。

### 17. 麻酔ラットにおける腸の侵害性伸展刺激による心拍数および血圧の反射性反応の神経性機序

○鈴木敦子<sup>1</sup>、李 為民<sup>2,3</sup> (<sup>1</sup>健康科学大学生理学, <sup>2</sup>復旦大学, <sup>3</sup>上海針灸経絡センター)

腸の侵害性伸展刺激による心拍数および血圧の反射性反応と、その神経性機序を麻酔した人工呼吸下のラットで検討した。中枢神経無傷ラットにおいて、肛門から約6cmの位置の腸に挿入したバルーンに空気を注入し、その内圧を20, 40, 60, 80mmHgに20秒間ずつ上昇させたところ、60および80mmHgの侵害性刺激により、刺激強度に依存して心拍数と血圧は減少した。これらの反応はアトロピン投与あるいは頸部迷走神経の切断によって影響を受けなかった。さらに心臓および腎交感神経(血管収縮神経)の活動は腸侵害性刺激により刺激強度に依存して低下した。これらのことから中枢神経無傷時には、腸侵害性刺激は反射性に心臓および血管支配の交感神経活動を低下させ、心拍数および血圧を減少させると考えられた。第2頸髄で脊髄を切断すると、腸侵害性刺激は中枢神経無傷時とは逆に腎交感神経活動と血圧を有意に上昇させた。しかし同じ刺激は心臓交感神経活動にも心拍数にも有意な影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、腸の侵害性刺激は、1)中枢神経無傷時には脳を中枢、交感神経を遠心路として心拍数と血圧を反射的に低下させること、2)脊髄性には交感神経血管収縮神経の活動を増加させて昇圧反応を誘発すること、が明らかになった。腸の侵害性伸展刺激によって脊髄性に誘発される血圧上昇反応は、脳が存在下では抑制されていると考えられた。

### 18. メチレンブルーはマウスのアナフィラキシー低血圧を抑制しない

○高野博充、崔 森、趙 占勝、芝本利重(金沢医科大学 生理機能制御学)

【目的】近年肥満細胞脱顆粒剤によるウサギ低血圧モデルでメチレンブルーが血圧低下抑制作用を示したと報告された(Shock 23: 582-587, 2005)。そこでアナフィラキシーモデルにおけるメチレンブルーの抑制効果を検討した。

【方法】Balb/Cマウス(8-10週齢)を卵白アルブミンで感作しアナフィラキシーモデルを作成。体血圧、中心静脈圧、門脈圧を測定。抗原投与によりアナフィラキシー反応

を惹起させた。メチレンブルーは抗原投与2分前に外頸静脈から投与して、各血圧のアナフィラキシー反応に対する効果を調べた。

【結果】アナフィラキシーモデル動物では、87mmHgであった体血圧が抗原投与によって49mmHgに下降した。5.3cmH<sub>2</sub>Oであった門脈圧は抗原投与によって9cmH<sub>2</sub>Oまで上昇した。メチレンブルーを投与した動物では抗原投与により98mmHgであった体血圧が51mmHgにまで下降した。このとき門脈圧は初期値5.1cmH<sub>2</sub>Oから9.2cmH<sub>2</sub>Oへ上昇した。

【考察】卵白アルブミン感作によるマウスアナフィラキシーショックモデルにおいてメチレンブルーは抗原投与による低血圧を抑制せず、メチレンブルーは実際のアナフィラキシー低血圧に対して有効な治療薬ではないことが示唆された。

### 19. マウスとラットのアナフィラキシー低血圧に対する体位(head-upとhead-down)の影響

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

【目的】我々はアナフィラキシーショックにおいて門脈圧の亢進が低血圧に関与することを示してきている。今回、本症の低血圧に対して下肢を高い位置に保つ、head-down tiltとその反対のhead-up tiltの体位の影響を門脈圧に注目して麻酔下自発呼吸下のSDラットとBALB/Cマウスで比較検討した。

【方法】卵白アルブミンで感作、2週間後に体血圧、中心静脈圧、門脈圧、心拍数を測定して実験を行った。head-downとhead-upはそれぞれ30度の傾斜をつけ、その状態で抗原を静脈内投与にした。

【結果】コントロールではマウスとラットともに抗原投与後体血圧は60mmHgに低下した。一方、門脈圧はラットでは20cmH<sub>2</sub>Oまで著明に上昇したが、マウスでは10cmH<sub>2</sub>Oまでしか上昇しなかった。head-downはマウスの血圧低下を4.5分より有意に抑制した。一方、ラットは25分後に抑制がみられた。head-upは両種ともに低血圧に影響しなかった。

【考察】マウス、ラットともに30度のhead-down tiltはアナフィラキシー低血圧を抑制した。また、マウスでは門脈圧上昇が小さいため、ラットに比べその抑制効果が大きいことが示唆された。

### 20. マウス、ラット、モルモットにおける血小板活性化因子の肝血管収縮反応に及ぼす一酸化窒素の影響

○崔 森、芝本利重、趙 占勝、高野博充、倉田康孝

(金沢医科大学 生理機能制御学)

【目的】血小板活性化因子 (PAF) の肝血管収縮が一酸化窒素 (NO) により修飾されるか、NO 合成阻害剤である L-NAME を前処置して ddY マウス、SD ラット、モルモットの肝臓を摘出し希釈血液で定流量灌流して検討した。

【対象と方法】門脈圧、肝静脈圧、門脈血流量を測定した。また、肝類洞圧を門脈と肝静脈の同時閉塞時の平衡圧である double occlusion pressure により測定し、前類洞抵抗と後類洞抵抗を求めた。L-あるいは D-NAME (100 $\mu$ M) を前処置後に PAF を灌流液に累積的に投与した。

【結果】いずれの種においても D-NAME 前処置の肝臓では PAF は用量依存性に前類洞優位の血管収縮を惹起した。その反応はマウスで最も弱かった。L-NAME はラットとモルモットでは PAF の前類洞収縮を増強したが後類洞収縮には影響しなかった。また、L-NAME はマウスの PAF への反応には有意な影響を及ぼさなかった。

【考察】ラット、モルモットでは PAF は前類洞血管に作用して NO 産生を促進することが示唆された。一方、マウスの PAF に対する肝血管反応は弱く、L-NAME の効果も無く、PAF により有意な NO 産生は生じないことが示唆された。

## 21. ヒト心室筋由来バイオペースメーカー細胞の構造安定性と心室ドライブ機能に対するペースメーカー電流導入の影響：カップル細胞モデルによる非線形力学的解析

○倉田康孝<sup>1</sup>、松田裕之<sup>2</sup>、久留一郎<sup>3</sup>、芝本利重<sup>1</sup> (金沢医科大学・生理機能制御学、<sup>2</sup>京都大学細胞・生体機能シミュレーションプロジェクト、<sup>3</sup>鳥取大学大学院医学系研究科・機能再生医学)

バイオペースメーカー (BP) の構造安定性と心室ドライブ機能の強化におけるペースメーカー電流導入の有効性を検証するため、ヒト心室筋由来 BP 細胞モデルの分岐構造に対する各電流導入の影響を解析した。BP 細胞と非ペースメーカー (NP) 細胞をギャップコンダクタンス (GC) で連結した細胞カップルモデルを構築し、その平衡点とダイナミクスの GC 依存性を示す分岐図を作成した。過分極活性化陽イオンチャンネル電流 (I<sub>h</sub>)、T 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネル電流 (I<sub>Ca, T</sub>)、持続性内向き電流 (I<sub>st</sub>)、低電位活性化 L 型 Ca<sup>2+</sup> チャンネル電流 (I<sub>Ca, LD</sub>) の導入における分岐構造の変化を解析した。BP 活性が消失する臨界 GC 値 (Hopf 分岐点) は I<sub>st</sub> 又は I<sub>Ca, LD</sub> の導入により上昇したが、I<sub>h</sub> や I<sub>Ca, T</sub> の導入では殆ど変化しなかった。I<sub>Ca, T</sub>、I<sub>st</sub> 又は I<sub>Ca, LD</sub> の導入により Saddle-node 分岐が生じ、安定な BP 活性及び心室筋ドライブがもたらされた。I<sub>h</sub> 導入は NP 細胞の IK1 電流が比較的小さい場合にのみ有効であった。I<sub>st</sub> 導入

は比較的安定した BP 活性及び心室筋ドライブをもたらす。BP 細胞の構造安定性及び心室ドライブ機能の強化には I<sub>st</sub> の導入が最も有効であると考えられた。

## 22. 脳スライス標本を用いた容積感受性クロライドチャネルの過興奮毒性神経細胞死への関与の検討

○井上 華、岡田泰伸 (自然科学研究機構・生理学研究所・細胞器官研究系・機能協働部門)

グルタミン酸受容体の過剰刺激による神経細胞死は過興奮毒性と呼ばれ、虚血やてんかんなどの病態に深く関連していることが知られている。これまでに我々は、グルタミン酸受容体の持続的な活性化が神経細胞の膨張をもたらしてネクロシスを引き起こすメカニズムを初代培養神経細胞を用いた実験系により検討し、容積感受性クロライドチャンネルが重要な役割を果たしていることを明らかにした。容積感受性クロライドチャンネルは細胞膨張によって活性化され細胞容積調節を担うチャンネルであるが、過興奮刺激によっても活性化される。過興奮時に見られる神経細胞の持続的な膨張には、容積感受性クロライドチャンネルを介するクロライドの流入が必要で、このチャンネルを薬剤により抑制すると、過興奮による神経細胞の膨張とネクロシスが抑えられる。今回我々は脳皮質スライス標本を用い、スライス標本中の皮質錐体神経細胞にも初代培養神経細胞と同様に容積感受性クロライドチャンネルが発現していることをホールセルパッチクランプ法により明らかにした。また、脳スライス標本に過興奮刺激を与えると、容積感受性クロライドチャンネルの阻害剤存在下で有意に神経細胞死が抑制されることを明らかにした。

## 23. Ca-dependent activation of glycolytic ATP production is a major contributor for the elevation of ATP level during the early stage of apoptosis

M.V. Zamaraeva<sup>1,2,3</sup>、O.R.Z. Sabirov<sup>1,2</sup>、K. Manabe<sup>1</sup>、and Y. Okada<sup>1</sup> (Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki 444-8585, Japan, <sup>2</sup>Department of Biophysics, National University, Tashkent 700095, Vuzgorodok, Uzbekistan, <sup>3</sup>Department of Biophysics, University of Bialystok, Bialystok 15-950, Poland)

We have shown earlier that the cells die with increased cytosolic ATP, and elevation of cytosolic ATP level is a requisite to the apoptotic cell death process, both mitochondria-mediated and death-receptor-controlled ones (Zamaraeva et al. *Cell Death Differ.* 2005, 12: 1390-1397). In order to characterize the bioenergetic source of ATP increase, we studied the effects of mitochondrial and glyco-

lytic inhibitors on staurosporine(STS)-induced ATP elevation in HeLa cells. In the presence of an uncoupler of oxidative phosphorylation, pentachlorophenol, or an inhibitor of mitochondrial respiration, NaCN, the content of intracellular ATP dropped by about 50%, suggesting that mitochondrial ATP production is involved in maintaining the basal levels of ATP within HeLa cells. Under the experimental conditions where mitochondrial ATP production was suppressed by either of these drugs, STS induced an increase in intracellular ATP, which was comparable in magnitude to that in control conditions without drugs. However, when glycolysis was suppressed in the presence of a non-metabolized analog of glucose, 2-deoxyglucose and an inhibitor of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, iodoacetamide, we did not find any effect of STS on intracellular levels of ATP. The STS-induced ATP increase was accompanied by a substantial increase in the intracellular free  $Ca^{2+}$  concentration. A Ca-ionophore, ionomycin, induced an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  and in intracellular ATP, whereas chelation of the extracellular  $Ca^{2+}$  by EGTA and of the intracellular  $Ca^{2+}$  by BAPTA-AM completely abolished the effect of STS on the intracellular ATP level. Based on these findings, we suggest that Ca-dependent activation of glycolytic ATP production is a major contributor for the elevation of ATP level during the early stage of apoptosis. We suppose that mitochondria have a minor, if any, contribution to the pre-apoptotic STS-induced ATP increase in HeLa cells.

#### 24. 蛍光性グルタミン酸可視化プローブを用いたシナプス伝達の可視化解析

○並木繁行, 坂本寛和, 飯沼 将, 廣瀬謙造 (名古屋大学大学院医学系研究科細胞生理学)

グルタミン酸は中枢神経での興奮性伝達物質として神経機能の制御に非常に重要な役割を担っている。現在までに、グルタミン酸を介するシナプス伝達に関する知見は電気生理学的・生化学的研究によって行われてきた。しかしながら、これらの手法では時空間情報を含んだ多次元なデータを取得、解析することは不可能であり、神経機能を理解する上で大きなネックとなっている。我々は本研究において、グルタミン酸の蛍光イメージング法を開発することでシナプス伝達の直接的可視化解析を目指した。

蛍光性のグルタミン酸可視化プローブを AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 サブユニットの細胞外領域と蛍光色素オレゴングリーンのコンジュゲートすることで作製し

た。可視化プローブを培養海馬神経細胞の細胞膜表面に固定化し、神経活動依存的に放出されるグルタミン酸の可視化を優れた空間解像度で実現した。さらに、ホルボールエステルによって惹起されるグルタミン酸放出の増強を空間情報を含んだ形で抽出し、シナプス強度変化の直接的評価が可能であることを示した。また、TTX 存在下で自発的かつ確率的に生じる非常に狭い領域でのグルタミン酸放出を検出した。この現象はスクロースの添加によって増強されるなど、電気生理学的に知られている微小興奮性シナプス後電位 (mEPSC) と非常に良く似た特性を有していた。興味深いことに、シナプス部位以外の場所からも未知の機構によって自発的に生じるグルタミン酸の放出が観察された。以上の結果は高解像度でのグルタミン酸の空間動態の解析に、蛍光性グルタミン酸可視化プローブが大きな貢献をすることが可能であることを示すものである。

#### 25. 軸索損傷後の末梢神経で誘導される遺伝子群の探索

○横山 茂, 東田陽博 (金沢大学大学院医学系研究科脳細胞遺伝子学)

哺乳動物の末梢神経軸索が損傷されると、損傷部位より遠位側では Waller 変性が生じ、近位側では軸索の再生が始まる。本研究では軸索再生に関与する分子を明らかにすることを目的として、近位側断端で発現誘導される遺伝子の単離を行った。成体ラットの左坐骨神経を切断し、3—7 日後に近位側断端および健常な右坐骨神経幹から mRNA を抽出した。cDNA 合成の後、サブトラクション・ハイブリダイゼーション法を行い、cDNA クローン約 150 個を得た。これらの塩基配列を決定し、GenBank/EMBL/DBJ に登録されているデータと比較したところ、89% が既存の配列と一致もしくは高い相同性を示した。コードされるタンパクの内訳は、細胞外マトリックスおよび受容体等の細胞膜表面分子 25%、細胞骨格関連分子 14%、リン酸化酵素等の代謝酵素 18%、分泌タンパク 11%、RNA 合成関連分子 4%、タンパク合成関連分子 4%、細胞周期・DNA 複製関連分子 3%、その他 21% であった。一方、既知の塩基配列との類似性が認められないものが 11% 存在した。今後これらの分子が軸索再生に果たす役割を検討したい。

#### 26. 魚類視神経再生分子の再生及び発生における発現パターンの比較

○村山大育<sup>1</sup>, 田中聖<sup>2</sup>, 永島幹子<sup>3</sup>, 加藤 聖<sup>1</sup> (1 金沢大・院医・脳情報分子, 2 北陸大学・薬・生化学, 3 金沢大・院医・保健学)

ゼブラフィッシュなどの魚類は中枢神経が一度損傷されても軸索は再生することが可能である。このため、人の中

視神経再生を目指し神経再生分子の探索が近年急速に進んでいる。また、ゼブラフィッシュは中枢神経の発生研究にも盛んに使用されている。本研究は成魚ゼブラフィッシュの視神経再生時に増加する分子が発生においてどのような発現変化を示すか検討した。すでに我々は成魚ゼブラフィッシュの視神経損傷後に増加する分子としてプルプリン、GAP-43などを報告してきた。プルプリンとGAP-43について再生・発生の発現パターンの比較を行ったところ、発生でもこれら二つの分子が発現していることが明らかとなった。また、特にプルプリンでは再生と発生で発現部位が異なっていた。さらに、GAP-43とプルプリンは発生後期にも発現してくることが明らかとなった。以上のことから、GAP-43とプルプリンは発生でも何らかの影響を及ぼしており、特にプルプリンでは再生と発生で機能が違うことが示唆された。また、GAP-43とプルプリンがゼブラフィッシュ網膜の発達段階において、二相性の発現をしていたことは新たな発見である。

## 27. 視神経損傷後のラットおよび金魚網膜における細胞死/生存シグナルの比較

○本間啓子<sup>1,2</sup>、郡山恵樹<sup>2</sup>、松川 通<sup>2</sup>、加藤 聖<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大院・医・保健学専攻、<sup>2</sup>金沢大院・医・脳医科学専攻)

視神経を損傷すると網膜神経節細胞(RGCs)は、ラットでは死滅脱落し、一方金魚では再生し視覚機能も回復する。両種でのRGCsのこの大きな違いのメカニズムを探るため細胞死/生存シグナルとしてBcl-2ファミリー、Caspase-3等を経時的にかつ詳細に比較検討した。まずラット網膜ではリン酸化p-Aktおよびp-Badの活性が損傷後2~3日で急速に低下した。引き続いて6日以降BaxおよびCaspase-3の活性上昇が見られ、それに伴い有意なRGCsの細胞脱落が始まった。これらの変化はすべてRGCsに局限していた。一方金魚網膜では、p-Aktおよびp-Badの急激な活性上昇が損傷後3~5日で見られ、その後20~30日まで持続した。Caspase-3はラットと異なり10~20日にかけて有意に減少し、Baxの活性は変わらなかった。これらの変化はすべてRGCsに局限していた。この様に、視神経損傷後早い時期でのp-Aktの増減が特徴的であった。このp-Aktの変化はすべてwortmannin依存性であったのでPI3Kを介するシグナルが想定された。種々のneurotrophic factorを検索した所、インシュリン様成長因子-I(IGF-I)が両種においてRGCsのp-Akt活性を上昇させた。IGF-I mRNA、蛋白レベルを調べたところ、ラットでは損傷後1日で低下し、金魚では1~2日で有意に増加した。更に成熟網膜片に対するIGF-Iの作用を見たところ、両種共、著明に神経突起の伸長を促進した。このIGF-Iの局在もRGCsに局限していた。

これらの事実からIGF-Iが両種において視神経再生の成否を決定するキー分子であることがわかった。

## 28. 金魚視神経再生過程におけるフェリチンの発現

○加藤保志<sup>1</sup>、永島幹子<sup>2</sup>、松川 通<sup>2</sup>、村本健一郎<sup>1</sup>、加藤聖<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大院・自然科学研究科・電子情報工学専攻、<sup>2</sup>金沢大院・医・脳医科学専攻)

魚類の視神経は損傷を受けても再生できることが知られている。この再生過程において、神経突起の伸長に関与する分子の報告は多くされているが、再生後期過程、特に視蓋において働く分子の報告はほとんどない。そこで、本研究では金魚視神経再生後期過程を明らかにする目的で、視蓋において視神経損傷後に発現量がゆっくと増える遺伝子をクローニングし、解析を行った。

ディファレンシャルハイブリダイゼーション法によって得た、視神経切断後に視蓋において発現量が増加するクローンについて、塩基配列を調べた結果、全塩基数は858bpであり翻訳領域は534bpであった。既知遺伝子と類似性を検索した結果、ニジマスのferritin H-1のmRNAと77%の相同性を示した。これにより視神経損傷後視蓋において発現量の増加したこの分子はferritinであることがわかった。

視蓋でのferritin mRNAの経時的変化を調べたところ、視神経切断直後から徐々に増加し、60日でピークになり、その後減少することがわかった。また視神経切断後50日の視蓋では、mRNA発現部位はSFGS、SGC、SAC、SPVと呼ばれる視神経と視蓋がシナプスを形成する領域と、主に神経細胞から成っているSPVであった。これらの結果から、ferritin H-1は、シナプス再形成に何らかの関与することが示唆される。

## 29. 金魚視神経再生過程における接着分子SynCAMの発現変化

○胡桃沢智子<sup>1</sup>、安永さおり<sup>1</sup>、馬渡一浩<sup>1</sup>、加藤 聖<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大院・医・保健学専攻、<sup>2</sup>金沢大院・医・脳医科学専攻)

魚類の視神経は、損傷しても再生することができる。この視神経再生過程において、視神経切断が網膜神経回路網にどのような影響を及ぼしているかについての報告は少ない。網膜ではさまざまな種類の細胞がシナプスを形成し、機能的な神経回路を構築していることから、我々は、シナプス形成に関与する細胞接着分子に着目した。その中でも、Synaptic Cell Adhesion Molecule (SynCAM)について、金魚視神経損傷後の網膜における発現変化を調べた。

まず、ゼブラフィッシュのSynCAM塩基配列を参考に

設計したPCRプライマーと、金魚網膜から抽出した全RNAを用いてRT-PCRを行った。得られたバンドcDNAの塩基配列を決定したところ、ゼブラフィッシュSynCAMと87.5%の高い相同性が見られた。さらに、網膜におけるmRNA量及びタンパク量の経時変化を調べたところ、視神経損傷後、二峰性に増加が見られた。タンパク質の局在及び発現変化は、内網状層、外網状層、外顆粒層で見られた。内網状層、外網状層はそれぞれシナプスを形成する場所であることから、視神経損傷は、網膜神経回路のシナプス形成に影響を与えることが示唆される。

### 30. 発達初期脳損傷後の前肢運動機能回復

○高橋雅人<sup>1</sup>, A. Vattanajun<sup>2</sup>, 伊佐 正<sup>1</sup> (1)自然科学研究機構 生理学研究所 認知行動発達機構研究部門, (2)Dep. of Physiol., Phramongkutklao College of Med., Bangkok, Thailand)

[目的] ラットを用いて1) 出生直後に片側皮質を行った場合に障害側前肢運動機能は回復するか、2) 機能代償のために健常側由来の皮質脊髄路に大規模な再組織化が起きるか否かを検証した。

[方法] 生後5日令で右脳皮質を吸引除去(First lesion)した。生後10, 14週令から前肢運動機能を解析した。6週後、左脳皮質運動関連領域を吸引除去(Second lesion)し、行動解析を行った。また皮質脊髄路の再組織化を検証するため順行性、逆行性神経トレーサー実験を行った。

[結果] First lesion後、健常側に比べると不十分だが、障害側前肢の運動機能に回復が見られた。Second lesion直後、両側前肢運動は一旦顕著に障害された。一方、順行・逆行性トレーサー実験により、健常側由来の皮質脊髄路から障害側への投射が新たに生じることが確認できた。

[考察] 発達初期脳損傷後、障害側前肢に機能回復が観察された。障害側前肢の運動は、同側大脳皮質からの新たな経路の生成による可能性が示唆された。

### 31. 鍼刺激による特有の感覚(ひびき感)が脳活動に及ぼす影響: 全頭型NIRS(近赤外分光法)による検討

○高本考一, 竹内幹伸, 小林恒之, 堀 悦郎, 梅野克身, 酒井重数, 小野武年, 西条寿夫(富山大学医学部大学院・システム情動科学)

鍼治療では、トリガーポイント(TPs)に対する鍼刺激特有の感覚である「ひびき感」が治療効果の指標として重要であることが示唆されている。本研究では、TPsへの鍼刺激によって生じるひびき感が脳活動に与える影響について全頭型NIRSを用いて検討した。実験では、正常被験者の頭部にNIRSの送受光プローブを設置し、各プローブの位置

は、脳定位的にディジタイザーで測定した。刺激部位は右前腕部総指伸筋とし、触診にてTPsを同定した。鍼刺激は、TPsに鍼を約1cm挿入後、上下運動を行った。測定後、加算平均による酸化型Hb濃度マップ、および一般線形モデルによるT値マップを作成した。またこれら解析データを、各被験者の頭部3D-MRI上に脳定位的にスーパーインポーズし、解剖学的同定を行った。その結果、ひびき感を誘発したTPsへの鍼刺激では、両側補足運動野(SMA)領域における酸化型Hb濃度が有意に減少することが明らかになった。従来の研究により、過剰な運動出力が様々な疼痛の病態の一つであることが示唆されており、TPsの鍼刺激はSMAの活動を抑制することにより鎮痛に関与すると考えられる。

### 32. 視線のポップアウト

○永福智志, 大湊 絢, 田村了以, 小野武年(富山大学大学院・医学薬学研究部・統合神経科学)

視野の中に、われわれ自身に向けられた「視線」が存在するとき、われわれの注意は自然にそのような「視線」に向かうことが多い。一般にヒトの視覚情報処理は、注意の関係しない前注意的過程とそれにひき続く注意依存的な過程から成立すると考えられる(Wolfe et al, 1989など)が、このような「視線」の情報は前注意的に処理されている可能性がある。ある視覚情報が、前注意的に処理されるのか、注意依的に処理されるのかは、混在する複数の視覚刺激から特定の対象を見つけ出す視覚探索課題における探索速度の解析から明確にすることが可能である。本研究では、「視線」が前注意的に処理されるのか、注意依的に処理されるのかを明確にする目的で、複数の健常者に「視線」に基づく複数の視覚探索課題を遂行させ、探索速度を計測した。実験の結果、「視線」(正立像)に基づく視覚探索課題における探索速度は、約40%の被験者において10ミリ秒/item以下であり、並列探索を行っていることが明らかになった。すなわち、半数弱の被験者において、「視線」の情報は前注意的に処理されると結論づけられた。また正立像と倒立像の「視線」における視覚探索速度の違いから、「視線」に対する前注意的処理は正立像である場合に、より効率が良いことが示唆された。

### 33. サル扁桃体の神経細胞は強化子の相対的な好ましさをコードする

○平井大地, 細川貴之, 井上雅仁, 宮地重弘, 三上章允(京都大学 霊長類研究所 行動発現分野)

扁桃体の神経細胞は、強化子そのものに応答性を示し、さらに強化子を予告する手がかり刺激にも応答することか

ら、刺激と強化子の連合に寄与していると考えられる。しかし、強化子の持つ価値は動物の置かれている文脈に依存して決まるものである。例えば、手近にさらに好ましい強化子が存在すれば、強化子の相対的な価値は減じるし、他に好ましくない可能性が存在すれば、相対的な価値は大きくなる。既に、学習課題遂行中のサル前頭眼窩野における単一神経細胞活動記録から、強化子の相対的な好ましさをコードする細胞が見つかっており(Hosokawa et al., 2005)、前頭眼窩野と相互神経連絡のある扁桃体で、強化子の価値が文脈に依存してコードされているか興味を持たれる。

扁桃体における強化子価値の表現が、同一ブロック内で得られる他の強化子に依存して決まるかどうかを確かめるため、ジュース、水に加えて、嫌悪刺激として電気刺激を導入し、ジュース-水条件と、水-電気刺激回避条件の二条件で記録を行った。その結果、水の予告に対して条件間で異なる応答性を示す細胞が確認された。扁桃体の細胞応答が強化子の絶対的特性のみならず、強化子の相対的な好ましさをコードしていることがわかった。

#### 34. An animal model of schizophrenia using primates

○C.V. Mao, E. Hori, R. Maior, T. Kobayashi, K. Umeno, T. Ono and H. Nishijo (System Emotional Science, Graduate school of Medicine, University of Toyama)

Disturbances in social skills (e.g., avoiding social contact, neglecting a surrounding environment, social isolation) are the most pervasive aspects of schizophrenic patients. Neural mechanisms of these social deficits are still unclear. However, there is no animal model of schizophrenia with deficits in social behaviors in primates. The purpose of this

study is to establish a primate animal model of schizophrenia by using phencyclidine (PCP) and methamphetamine (MAP) treatment. Four monkeys weighing 7 to 9kg were divided into 2 groups; control (n=2) and PCP groups (n=2). PCP group received chronic PCP treatment (0.3 mg/kg/day, i.m.) for more than 7 months. The PCP monkeys sometimes received additional acute MAP treatment (2 mg/kg.i.m.) (PCP + MAP group, n=2). Monkey behaviors were recorded by CCD cameras and analyzed automatically by computer software and manually by visual inspection. Social behaviors were analyzed while each of 2 monkeys was put in both side cages that were connected to a center cage. Non-social behaviors were analyzed while monkeys were put alone in a single cage. The results indicated that the PCP and PCP + MAP groups showed an increase in stereotyped behaviors (e.g., moving left and right, sitting and crouch) and a decrease in their own grooming. On the other hand, social behaviors (e.g., approaching to, leaving from, following, grooming with, and mounting on other monkey) were less frequently observed in the PCP than the control groups. The PCP group spent less time in close proximity to other monkey than the control group. Acute treatment of MAP with the PCP monkeys further decreased frequency of social behaviors and time spent in close proximity to other monkey. These results indicated that chronic PCP and acute MAP treatment induced human schizophrenic-like abnormal social behaviors, and suggest that these monkeys can be used for a primate animal model of schizophrenia.