

第33回東北生理談話会

会 期：平成12年10月27日（金）～28日（土）

会 場：福島県立医科大学

当番幹事：福島県立医科大学生理学第二講座 香山雪彦

福島県立医科大学生理学第一講座 清水 強

参 加 者：66名

東北生理談話会は、従来の大きな規模の学会と異なり、自分の専門分野以外の話題に触れる場にしよとの了解もと、演者も専門外の聴衆に自分の研究の全容を紹介するという点に重点をおき、発表に先立ち自分の研究の背景について3分程度のレビューを行なった。この方式は、異なった分野の研究の全体像を把握するよい機会であったとともに、(特に若手の)演者にとっては、自分の研究をわかりやすくアピールするという、従来の学会では得られない貴重な経験になったと思う。25題の発表が行なわれ、1人当たりの口演時間は18分と、従来の学会よりやや長めにとり、最初から少々の時間超過を想定してプログラムを組んだつもりであったが、やはり討論時間が長引き、主催者は懇親会の時間との兼ね合いに気をもむことになった。

1. 培養ヒト近位尿管細胞膜に存在する内向き整流性Kチャンネルの一般的特性

中村一芳, 平野順子, 久保川学 (岩手医大・医・第二生理)

パッチクランプ法を用い、ヒト腎近位尿管細胞膜に存在する内向きコンダクタンスが40～50 pSの内向き整流性Kチャンネルについて検討した。このチャンネルはコントロール条件下のcell-attached patchにて最も頻繁に認められたことより、近位尿管における物質輸送の駆動力となる細胞膜電位の形成に重要であると考えられた。PK/PNaは約7であり、膜電位変化によるチャンネル活性の変動は認められなかったが、cell-attached patchにて蛋白キナーゼ阻害剤の投与により活性が低下した。Inside-out patchにするとチャンネルのrun-down現象が観察されたが、それは浴液へのATP添加により阻止され、さらにチャンネル活性はATPの濃度(0.1～3 mM)依存性に上昇した。また、ATP存在下でAキナーゼを投与した時にもチャンネル活性が上昇したことから、このチャンネルはATP依存性であり、その調節には蛋白リン酸化が関与しているものと考えられた。

2. KCl/NaCl 負荷ラットの血液・尿中アルドステロンと電解質の変動

中屋重行, 吉岡芳親, 中村一芳, 平野順子, 久保川学 (岩手医大・医・第二生理)

アルドステロンは腎遠位尿管でのNa再吸収及びK分

泌を促進し抗利尿作用を有することが知られている。今回、体液Na/K調節に及ぼすアルドステロン作用を調べる目的で、高濃度のKCl及びNaCl溶液を飲料水としてSprague-Dawley雄ラットに14日間飲ませて、血液と尿中の電解質並びにアルドステロン濃度を測定し、その影響を見た。

1) 400mM KCl摂取後に尿量は増加し、体重は減少したが、400mM NaCl摂取時には尿量・体重の有意な変化は見られなかった。飲料水・エサ摂取量・便排泄量はほぼ一定で、臓器重量はcontrolラットとの有意差が無かった。

2) 血漿および尿中アルドステロンは、高KCl負荷では有意に増加したが血漿K, Na, Cl濃度は正常で、一方、高NaCl負荷ではアルドステロンは減少し、血漿Na濃度は上昇し 体液電解質のホメオスタシスを逸脱した。

3) 尿中K, Na, Cl排泄量は摂取量に比例して増加し、3日以内に電解質摂取量の85%が尿中に排泄された。しかし、K負荷によるアルドステロンの分泌増加は3～7日の時間差があり、高K負荷によるK⁺排泄の増加には必ずしもアルドステロンが関与していないことが示唆された。

3. ATPにより抑制されるヒト近位尿管細胞膜のMaxi-Kチャンネル

平野順子, 中村一芳, 吉岡芳親, 中屋重行, 久保川学 (岩手医大・医・第二生理)

培養ヒト腎近位尿管細胞膜のCa依存性を示すMaxi-Kチャンネルの特性についてパッチクランプ法を用いて調べた。このチャンネルは通常のcell-attached patchでは観察さ

れないが、コントロール溶液 (10^{-3} M Ca 存在) での inside-out patch では約 50% の patch で認められ、チャンネルコンダクタンスは約 290pS であった。チャンネル活性は inside-out patch にて溶液中の Ca が 10^{-4} M 以上で最大となり、 10^{-6} M 以下ではほぼ完全に消失した。また、膜の脱分極で活性が上昇し、過分極で低下した。K チャンネルブロッカーである Ba は inside-out patch にてチャンネル活性を阻害したが、TEA は阻害しなかった。さらに、このチャンネルは溶液に Ca 存在下で、ATP ($1 \sim 3$ mM) 添加により活性が抑制され、非水解性の ATP アナログである AMP-PMP によっても同様に抑制された。以上より、このチャンネルは他の Maxi-K チャンネルと同様に Ca 依存性や電位依存性を示すとともに、ATP 感受性 K チャンネルの一種でもありと考えられた。今後、ATP 感受性 K チャンネル阻害剤である Glibenclamide 等の効果についても検討し報告する。

4. マウス腹腔マクロファージに対する副腎皮質刺激ホルモンの作用

福島央之¹、一ノ瀬充行²、新貝御蔵²、澤田正史³ (岩手大・工・¹電子情報工学、²福祉システム、³島根医科大・生理)

免疫担当細胞に対する副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の作用を明らかにするために、マウスの腹腔マクロファージを標本としてイオンチャンネルの活性を perforated patch-clamp 法を用いて解析した。副腎皮質刺激ホルモンを微量投与すると、培養マクロファージに外向き電流を生じた。副腎皮質刺激ホルモンによる外向き電流の反転電位は細胞外液 K^+ の濃度に依存したが、細胞外液 Cl^- の濃度には依存しなかった。さらに、イオンチャンネルブロッカーの作用を検討した。Quinine は外向き電流を効果的に阻害できたが、tetraethyl-ammonium (TEA) の抑制効果はやや弱かった。EGTA を含んだ Ca^{2+} 非存在下の細胞外液においては、外向き電流は生じなかった。これらの結果から、副腎皮質刺激ホルモンは Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルの活性化を介してマクロファージの生理機能を修飾できる可能性が示唆された。

5. 線虫 *C. elegans* の GABA 系変異体における行動の特徴

新貝御蔵、坂田和実、小栗栖太郎、一ノ瀬充行 (岩手大・工・福祉システム)

C. elegans の 2 種類の変異体 unc25 (GABA 合成酵素遺伝子の欠損) と、unc47 (GABA vesicular transporter の欠損) について、移動運動 (前進・後退) と停滞 (休止)

の期間に関する頻度分布を求めた。unc25 の前進期間の平均は、unc47 や野生種 (N2) のそれよりも短かった。後退期間は、unc25、unc47、N2 の間でほとんど差が無かった。これら 2 種の変異種と野生種間の差異、及び同一種について餌のバクテリアの有無により行動に現れる差異について報告する。

6. 経路選択課題遂行時のヒト大脳皮質の fMRI による解析

虫明 元、丹治 順 (東北大・医・生体システム生理)
経路のプランニングにおける大脳皮質の働きを調べる目的で、迷路課題を考案し、実行中の大脳皮質の活動を機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) により解析した。この迷路課題においては、迷路内のカーソルをスタート点からゴールまでの経路を選択して、スイッチの操作によりカーソルをゴールまで移動させる。また、スイッチ操作と経路内のカーソルの動きとを解離させることで、経路選択に関わる脳の活動と、カーソル操作の実行期の活動を分離できるようにした。さらに、試行内のイベントに関連した大脳皮質の活動も解析したので報告する。

7. ラット視床の侵害受容細胞に対する内包条件刺激の効果

岡田伸男¹、松本範雄²、久保田稔¹、北田泰之² (岩手医大・歯・¹第一保存、²口腔生理)

扁桃体条件刺激による痛覚抑制作用を調査中、その核の背側に位置する内包条件刺激が皮膚の痛覚刺激に対する視床細胞の応答を減少することを観察した。今回はこの内包による痛覚抑制の神経生理学的機序を調べるための予備実験である。実験には笑気と酸素の混合ガスおよび 0.5% のハロタンで麻酔し、臭化パンクロニウムで不動化したラットを用いた。顔面皮膚の侵害刺激に応じる細胞を視床の後内側腹側核 (VPM) と後核群 (PO) を中心に検索し、それらの細胞の末梢受容野への電気 (試験) 刺激に対する応答を痛覚の指標とした。記録側に対し反対側の内包への条件刺激として duration が 0.5msec、300 μ A のパルス を 330Hz で 100msec の間、連続的に与えた。C-T 間隔は 50msec とした。24 個の広作動域 (WDR) 細胞と 15 個の特異的侵害受容 (NS) 細胞の大多数が VPM と PO に散在して記録され、それらの分布に規則性は認められなかった。内包条件刺激は 10 個中 4 個の WDR 細胞と 2 個中 1 個の NS 細胞をコントロール応答の 15 ~ 45% にまで抑制した。これらの結果は、求心路遮断痛やニューロパシックペインなどの治療に用いられている内包の電気刺激が表在痛をも抑制する可能性を示唆する。

8. 脳幹のコリン作動性ニューロン、アミン作動性ニューロンに対するプロラクチンの作用

高橋和巳¹, 小山純正¹, 香山雪彦¹, 山本光璋² (¹福島医大・医・第二講座, ²東北大・情報科学・生体情報)

プロラクチン (PRL) は哺乳類では、乳汁産生を促す下垂体ホルモンであるが、授乳期の眠気にも関連するとされ、ラットの皮下あるいは脳室内への投与により、逆説睡眠量を特異的に増加させることが報告されている。睡眠覚醒調節には外背側被蓋核 (LDT) のアセチルコリン (ACh) 作動性ニューロン、青斑核 (LC) のノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロン、背側縫線核 (DR) のセロトニン (5HT) 作動性ニューロンが重要な役割を果たしていると考えられるが、近年、視床下部のプロラクチンニューロンがこれらの領域に投射していることが明らかになってきた。そこで我々は、これらのニューロン群に対する PRL の作用を観測した。ウレタン麻酔下のラットの脳幹部にガラス管微小電極を刺入し、単一ニューロン活動を記録すると同時に、プロラクチン (0.04mg/ml) を記録電極に貼り付けた微小ガラス管から圧力により、記録中のニューロンの近傍に投与した。その結果、LDT の一部の ACh 作動性ニューロンおよび非 ACh 作動性ニューロンは、PRL 投与により、数十秒という長時間持続する興奮を示した。また、LC の NA 作動性ニューロン、DR の 5HT 作動性ニューロンでは無効であった。このことは、視床下部の神経ホルモンが、脳幹の睡眠調節機構の中でも逆説睡眠の発現に重要と思われる LDT のニューロン群に、特異的かつ直接的に効果を及ぼしている可能性を示唆する。

9. ラット外背側被蓋核のアセチルコリン作動性ニューロンの生後発達について

二宮治重子, 小山純正 (福島医大・医・第二生理)

外背側被蓋核 (LDT) のアセチルコリン (ACh) 作動性ニューロンは覚醒や逆説睡眠に関連があると考えられている。生後1週のラットでは全睡眠時間の約70%を逆説睡眠が占め、この割合は生後2週目には激減する。今回、choline acetyltransferase (ChAT) の活性と ChAT 抗体を用いた組織化学法で LDT の ACh 作動性ニューロンの生後発達を検討した。成熟ラットでは NADPH-diaphorase (NADPH-d) の組織化学が LDT の ACh 作動性ニューロンのマーカーとして使われており、幼若ラットでも NADPH-d 陽性細胞が見られるので、ChAT 陽性細胞の生後発達の変化を NADPH-d 陽性細胞の生後変化と比較した。その結果、ChAT 活性は生後1週までは非常に低く、2週目に急激に増加した。ChAT 陽性細胞は生後1日でも認められ、7日目には成熟ラットの NADPH-d 陽性細胞数

の80%程度になり、7日以降は殆ど変わらなかった。これらのことから、LDT には、生後1週目に既に ChAT 陽性細胞が存在しており、2週目にその個々の細胞の活性が増加し、機能するようになると思われる。この ACh 作動性ニューロンの生後発達は、逆説睡眠量の減少と同じ時間経過をたどる。

10. プロスタグランジン E (PGE) 受容体各サブタイプの腰仙髄副交感神経節前ニューロン (PGN) に及ぼす影響

三浦 章, 河谷正仁 (秋田大・医・第二生理)

副交感神経節前ニューロンに対する PGE₂, EP1 アゴニスト (ONO-D1-004), EP2 アゴニスト (ONO-AE1-259-01), EP3 アゴニスト (ONO-AE-248), EP4 アゴニスト (ONO-AE1-329), EP1 アンタゴニスト (ONO-8711) の作用について検討した。PGN には放電様式の違いから、tonic PGN と phasic PGN の2群存在する (Brain Res 872: 54-63, 2000)。PGE₂ (1 μM) は tonic PGN では活動電位 (AP) の閾値を変えず、活動電位後過分極電位 (AHP) の duration の短縮、脱分極性電流刺激に対する放電頻度の増加、刺激後の自発放電を認めた。ONO-8711 (1 μM) は tonic PGN の放電様式を間欠性放電に変えた。ONO-D1-004 (1 μM) は AP の閾値を変えず、AHP の duration を短縮させ (404 から 205 ms)、脱分極性電流刺激に対する放電頻度を変えずに、刺激後の自発放電を認めた。ONO-AE1-329 (1 μM) は AP の閾値の低下、AHP の duration の短縮 (263 から 180 ms)、脱分極電流刺激に対する放電頻度の増加が認められた。ONO-AE1-259-01 (1 μM) は効果がなかった。phasic PGN では、ONO-AE1-329 (1 μM) は持続性脱分極性電流刺激に対する放電頻度を増加させた。以上より、PGE₂ は EP1 と EP4 受容体を介して AHP の duration を短縮させ、EP3 受容体を介して AHP の duration を延長させたので、各種病態で放出される PGE は PGN の興奮性を直接変化させる可能性を示した。

11. メタコリンによる陰茎海綿体組織の弛緩と上皮細胞の細胞内 Ca²⁺ の増加

佐藤 実, 河谷正仁 (秋田大・医・第二生理)

アセチルコリン (ACh) によって陰茎海綿体組織が弛緩するが、その作用についてまだ不明な点が多い。このことを調べるため、ウサギの陰茎海綿体組織片の張力と海綿体組織の培養細胞中に存在する上皮細胞の細胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i; fura-2 による) の動態に対するムスカリニックアゴニストメタコリン (MCh) の効果を検討した。フェニレフリンの前投与によって収縮させておいた海綿体組織

は、MCh ($10^{-9} \sim 10^{-6}$) の投与によって濃度依存性に張力が減少した。このMChによる弛緩効果は、ヘキサメソニウムで影響されず、アトロピンで抑制され、特に、DAMP (M_3 レセプター阻害剤; $10^{-9} \sim 10^{-7}$) によって濃度依存性に阻害された。平滑筋細胞の $[Ca^{2+}]$ はAChに反応しなかったが、内皮細胞の $[Ca^{2+}]$ はMCh ($10^{-7} \sim 10^{-5}$) によって濃度依存性に増加した。この $[Ca^{2+}]$ 増加効果もヘキサメソニウムで影響されず、アトロピンやDAMP ($10^{-10} \sim 10^{-7}$) によって阻害された。以上から、AChによる海綿体組織の弛緩に内皮細胞の M_3 レセプターを介す $[Ca^{2+}]$ 増加が関与する可能性が考えられる。

12. 膵 Langerhans 島組織へのパッチクランプ法の適用

菅野隆浩¹, Sven Goel², Sebastian Brag², Patrik Rorsman² (¹弘前大・医・第一生理, ²Dep. of Mol. Cell. Physiol., Lund University, Sweden)

マウス膵 Langerhans 島 (islet) 内の β および δ 細胞を同定する目的で、この組織へパッチクランプ法を適用した。Islet は、摘出した膵臓をコラゲナーゼで分離して使用した。Amphotericin B による perforated patch 法にて膜電位を測定すると、10mM グルコースにて islet 内にある細胞に特有のバーストパターンを記録できた。一方、バーストパターンを示さない細胞 (非 β 細胞) も多く見られた。マイナス 70mV に膜電位固定し矩形波脱分極パルスを加えると、 β 細胞は Ca^{2+} による内向き電流だけを示したのに対し、非 β 細胞は Na^+ による大きな内向き電流をあわせ持っていた。これらの非 β 細胞は脱分極パルスで一過性に活性化される外向き K (A) 電流を持っていたが、tetraethylammonium (TEA) 感受性のあるものと無いものが見られた。レーザー顕微鏡を用いた抗ソマトスタチン抗体、抗グルカゴン抗体、各種抗 K_v チャネル抗体の同時染色による画像解析によって、 β 細胞が TEA によって抑制を受ける $K_{v3.4}$ チャネルを持つこと、 δ 細胞が TEA に対し感受性がない $K_{v4.3}$ チャネルを持つことを解かった。

13. Acetylcholine によるラット膵 細胞機能の調節

泉井 亮, 中野京子, 菅世智子, 武尾照子, 菅野隆浩 (弘前大・医・第一生理)

本研究では、acetylcholine (ACh) による膵 細胞の Ca^{2+} 動員について、その仕組みとインスリン分泌への関与を明らかにするため、ラット膵ラ島からのインスリン分泌、細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$), 膜電位, 膜電流の ACh 応答を解析した。ACh ($1 \mu M$) はインスリン分泌を促進したが、この効果は nifedipine で阻害された。ACh は細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ、この時間経過は、速い立ち

上がりをもつ初期相とゆっくりとした回復を示す後期相から成っていた。nifedipine は後期相を消失させた。ACh は細胞を脱分極させて、nifedipine 感受性の活動電位を発生させた。Whole-cell mode で記録すると、ACh は ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) を経由する膜電流を濃度依存性に抑制した。高濃度の EGTA を用いて細胞内の Ca^{2+} を強くキレートするか、細胞に GDP S や heparin を投与すると ACh の効果は消失した。Inside-out mode で、 Ca^{2+} 濃度を上昇させると ATP の K_{ATP} 抑制効果は増強した。以上の結果から、ACh 応答では、 IP_3 によって放出される Ca^{2+} が K_{ATP} の ATP 感受性を高めることで脱分極を生じ、これによって L-type Ca^{2+} channel が開口して Ca^{2+} 流入が起きること、この Ca^{2+} 流入がインスリン分泌に重要な役割を担っていることが示唆される。

14. 膵腺房細胞の muscarinic signaling に関与する 2 種の cyclic ADP-ribose 感受性受容体

福土靖江¹, 高沢 伸², 加藤一郎², 岡本 宏², 丸山芳夫¹ (東北大・医・¹細胞生理, ²生物化学)

外分泌腺における cyclic ADP-ribose (cADPR) の生理的意義はまだ不明である。前回私共は CD38 knockout mouse を用いた実験から、マウス膵腺房細胞における ryanodine (cADPR 感受性) 受容体をもつ Ca プールはおおまかに Ca 感受性により 2 種に分けられ、Ca 感受性の高い受容体をもつプールは muscarinic signaling における repetitive Ca spike (oscillation) に、 Ca^{2+} 感受性の低い受容体をもつプールは phasic response に関係するとの結論をえた。今回私共は ryanodine や caffeine の Ca signaling に対する効果、および RT-PCR 法による ryanodine 受容体の検出結果から、次の結論を得た: 10 μM ryanodine で開く受容体は repetitive Ca spike に関係し、RyR 2 で、500 μM ryanodine と 10 mM caffeine の混合投与で開く受容体は phasic response に関係し、RyR 3 ではないかと思われる。

15. 再び動物実験にかかわる情報公開問題について

片平清昭 (福島医大・医・実験動物)

情報公開制度は国よりも全国の自治体において先行して整備されてきたが、情報公開法が成立した現在、国の行政機関においてもその施行を待つばかりとなっている。情報公開制度は、動物実験反対運動を展開するための有力な手段として活用される恐れもある。日本生理学会には、「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(昭和 63 年 12 月 19 日制定)がある。生理学領域における動物実験は、この基本的指針や大学等の研究機関において制定され

ている動物実験指針にしたがって実施されているはずである。当然、動物実験指針にもとづいて作成された動物実験計画書も公文書として取り扱われることとなる。これらの指針は、情報公開を前提として作成されたものではなく、関係文書の開示請求があった場合にその対応に苦慮することとなる。福島県立医科大学では、平成7年に一県民から過年度分の動物実験計画書等の開示請求を受けたが、平成12年7月に、再度、別の県民から現在実験が実施されている動物実験計画書について開示するよう請求が出された。この件も含めて今回は、情報公開を前提とした動物実験計画書の考え方について紹介する。

16. 単一心筋細胞内に形成されるエネルギー代謝勾配

高橋英嗣, 土居勝彦 (山形大・医・第一生理)

ミトコンドリアの呼吸酵素 (cyt c oxidase) が要求する酸素濃度 (K_m) は $0.2 \mu\text{M}$ 以下である。一方、供給側の動脈血の酸素濃度は $150 \mu\text{M}$ で両者の間にはおよそ1000倍もの較差がある。これは、動脈血による酸素供給が、少なくとも正常心筋では、好氣的代謝を制限する要素には成り得ないことを意味するよう思える。しかし、最近、毛細血管から細胞の中心部までの間に大きな拡散性酸素濃度勾配が形成される結果、正常細胞の好気代謝は、酸素供給に依存していることが明らかとなってきた。今回は、単一心筋細胞を用い、細胞内の好気代謝をミトコンドリアの大きさに匹敵する解像度でマッピングすることにより、細胞内酸素濃度勾配と細胞のエネルギー代謝の関係を検討した。

17. ヒト不全心筋における endothelin 受容体発現の変化

浅野功治¹, T.J. Bohlmeier², J.Y. Westcott³, L.S. Zisman², M.B. Perryman², M.R. Bristow² (¹山形大・医・第一生理, ²Division of Cardiology, University of Colorado Health Sciences Center, ³National Jewish Medical & Research Center)

拡張型心筋症 (DCM) または虚血性心筋症 (ICM) による、末期心不全患者の左室における、endothelin ET_A および ET_B 受容体の発現を測定した。健常群に比し、両不全群で、 ET_A 受容体蛋白は増加し、 ET_B 受容体蛋白は減少した。 ET_A の mRNA 量は、両不全群で増加したが、 ET_B の mRNA 量は、DCM 群において著変なく、ICM 群において増加した。組織 endothelin-1 含量は、DCM 群でのみ有意に増加した。よって、ヒト不全左室心筋においては、 ET_A 受容体蛋白発現は、mRNA 発現レベルに依存する機構により増加するが、 ET_B 受容体蛋白発現は、それとは異なる機構により減少する、と結論した。また、不全心

筋におけるこれらの蛋白および mRNA 発現は、単に局所の endothelin-1 レベルによって調節されているわけではない、と考察した。

18. アンジオテンシンIIおよびエンドセリン-1による血管平滑筋MAPキナーゼ活性化と収縮張力発生

田崎勝成¹, 石幡 明², 犬塚淑子¹, 片野由美¹ (山形大・医・¹基礎看護薬理, ²第一生理)

アンジオテンシンII (AII) やエンドセリン-1 (ET-1) は、MAPキナーゼ (MAPK) を活性化し細胞増殖を惹起する。ウサギ脳底動脈のET-1による血管収縮にはMAPKの関与が示唆されている。しかし、以前の試験では、 $3 \mu\text{M}$ のPD98059はAIIによる血管収縮反応に影響を与えず、MAPKの関与は不確かだった。本研究では、AIIとET-1による血管収縮において、チロシinkinナーゼ (TK) とMAPKの関与を、ラット胸部大動脈を用いてさらに詳細に検討した。雄性Fischer 344ラット胸部大動脈から内皮を除去した短冊状標本を作製し、AIIおよびET-1の投与により発生する等尺性張力を測定した。AIIおよびET-1の収縮は、TKの阻害薬であるgenisteinの前処置によって共に有意に抑制された。また、いずれの収縮もMEK1阻害薬であるPD98059 ($10 \mu\text{M}$) 前処置により有意に抑制された。さらに、別のMEK1/2阻害薬であるU0126 ($10 \mu\text{M}$) によっても有意に抑制された。以上の結果からAIIおよびET-1の血管収縮機序には、TK活性化およびMAPKが関与していることが示唆された。

19. 遺伝性高コレステロール血症 (KHC) ウサギにおける動脈硬化の発症・進行にともなう大動脈壁レオロジー特性の変化

勝田新一郎¹, 和気秀文¹, 山崎将生¹, 永山忠徳¹, 清水強¹, 片平清昭², 長谷川正光³, 日柳政彦⁴ (¹福島医大・医・第一生理, ²同・附属実験動物研究施設, ³国立循環器病センター研究所, ⁴㈱日本医科学動物資材研究所)

大動脈壁のレオロジー特性は、動脈硬化などのよる壁の微細構築の変化と密接に関係すると考えられるので、4~6および10~12カ月齢 (M) の遺伝性高コレステロール血症 (KHC) ウサギおよび同月齢範囲の正常ウサギ用い、動脈硬化の発症・進行にともなう大動脈各部位の壁レオロジー特性の変化について比較検討した。摘出した大動脈の上行大動脈部、胸部大動脈近位部、腹部大動脈近位部において幅 $3.0 \mu\text{M}$ の円周方向の短冊状の壁切片を作製した後、引っ張り試験機を用いて切片を $4.17 \mu\text{M}/\text{min}$ の速度で伸展して応力 ひずみ試験を行った。その結果、泡沫細胞が主体の4~6MのKHCウサギの上行大動脈、10~12Mの

KHC ウサギの胸部および腹部大動脈近位部においては、壁張力は正常ウサギと著明な変化は示さなかったが、壁応力および壁弾性率は有意に減少した。また、10 ~ 12MのKHC ウサギの上行大動脈では病変が進行するにつれて、壁張力、壁応力および壁弾性率は有意に増加した。上記結果より、泡沫細胞が主体の病変が存在する部位では、壁は粘弾性的な性質を示し、線維化が進行するにつれて徐々に弾性的な性質を示す傾向にあると考えた。

20. 口唇血管を支配する交感神経血管収縮の役割について

和泉博之, 水田健太郎, 小枝聡子, 刈田啓史郎 (東北大・歯・口腔機能解析)

目的: 顔面, 口腔領域の血管は交感, 副交感, 三叉神経によって神経支配され, 交感神経は血管収縮, 副交感神経, 三叉神経は血管拡張反応に関与していると考えられている。その根拠はそれぞれの神経を電気刺激したときに血管収縮, 拡張反応が起こることからである。しかし近年交感神経は単独に血管収縮反応をおこすのではなく, 副交感神経, 三叉神経の興奮によって起こる血管反応を交感神経が調節している可能性が示唆されるようになってきている。そこで本研究では口唇血管を用いて交感神経の副交感神経血管拡張と三叉神経血管拡張反応に対する効果を検討することにより 頸部交感神経血管収縮線維の役割を推察した。

方法: ネコをケタミン筋注入眠後, ウレタン, クロラロースで麻酔し, パンクロニウム投与後人工呼吸下で実験した。交感神経刺激は頸部交感神経を末梢性に電気刺激した (10V, 2ms, 7 min, 0.2 ~ 2Hz)。副交感神経血管拡張線維の興奮は舌神経を求心性に刺激して反射的に興奮させる方法を用いた。三叉神経刺激による逆伝導性血管拡張反応は下歯槽神経を末梢性に刺して起こした。口唇血流はレーザーブロー血流計で測定した。

結果: 副交感神経性血管拡張反応は交感神経の周波数に応じて抑制を受けるが三叉神経性血管拡張は影響されない。歯槽神経神経中に含まれる交感神経による血管収縮反応は頸部交感神経の低周波数刺激により消失する。

結論: 交感神経収縮線維は血管拡張反応に対して副交感神経性血管拡張反応を選択的に抑制する。生理的範囲内である持続的交感神経収縮線維の興奮状態は, 以後に起こる交感神経性血管収縮反応を抑制する。

21. U46619 及びセロトニンで引き起こされる脳血管収縮における Rho-kinase の関与

幸治孝裕^{1,2}, 西川泰正^{1,2}, 土肥 守², 木村眞吾¹, 川崎敏¹, 佐々木和彦¹, 小川 彰² (岩手医大・医・¹第一生理,

²脳神経外科)

ウシ中大脳動脈リング状標本を製作して, タイロド液で灌流下, セロトニン (5HT) 受容体刺激をすると比較的時間経過の短い収縮が, また U46619 によりトロンボキサン A₂ 受容体を刺激すると時間経過の長い収縮が発生する。これらの収縮並びに 40mMK⁺ で引き起こされた収縮は CaM inhibitor の W-7 により顕著に抑制された。さらに Rho-kinase を抑制することが知られている Y-27632 の投与では 40mMK⁺ 収縮はわずかしき抑えられなかったが, 5HT 収縮や U46619 収縮はコントロールの 60% まで抑えられた。低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーを monoglucosylate する ToxinB で処理すると 5HT 及び U46619 収縮は著しく抑制された。さらに RhoA, B, C を選択的に ADPribosyl 化する C3 exoenzyme 処理では 40mMK⁺ 収縮は影響を受けず, 5HT 及び U46619 収縮のみが不可逆的に抑制された。以上のことから 5HT 及び U46619 による収縮応答に対して, Rho A 及び Rho-kinase が活性化して応答の増強をしていると推論した。

22. Xenopus oocyte 卵胞細胞に於ける FSH 及びアデノシン応答に対する ATP による抑制

藤田玲子¹, 木村眞吾², 川崎 敏², 高島浩一郎², 松本光比古³, 平野浩子¹, 佐々木和彦² (岩手医大・¹教養・化学, ²医・第一生理, ³弘前大医短・物理)

アフリカツメガエルの卵細胞に日本のガラス微小電極を刺入して -60mV に膜電位固定下, 卵胞細胞のもつ種々の受容体の性質とこれらの間の相互作用について調べた。1 μM の ATP と UTP を投与すると両者とも内向き電流応答を発生した。ATP 投与の場合に発生する内向き電流応答は 100 μM suramine 投与で半減したが, UTP 応答はあまり抑制されなかった。一方, 5.7 μM の FSH 又は 1 μM アデノシン (Ade) を投与するとゆっくりとした外向きの K⁺ 電流応答を発生した。この K⁺ 電流応答は細胞内に cAMP を注入すると mimic された。1 μM ATP 又は 1 μM UTP を 30 秒間前投与すると上記 FSH 又は Ade 受容体刺激及び cAMP 注入で発生する K⁺ 電流応答は著しく抑制され, 30 分間 wash out すると回復した。ATP 応答の用量作用曲線の ED₅₀ は, ATP が FSH 又は Ade 応答を抑える場合の IC₅₀ よりも約 10 倍高濃度側であった。また, ATP による抑制様式は非競合的であった。FSH, Ade 応答に対する抑制の作用部位は細胞内 cAMP の生成後, K⁺ channel までのステップであると推論した。

23. マウス黒質網様部神経細胞の K_{ATP} チャネルの特性と虚血における役割

汲 娟娟¹, 山田勝也¹, 堀本直幹¹, 古川哲史¹, 猪又八郎², 稲垣暢也¹ (¹秋田大・医・第一生理, ²国立療養所道川病院)

目的: 単離黒質網様部神経細胞に発現する K_{ATP} チャネルの特性ならびにそれに及ぼす虚血の効果について検討した。

方法: 生後 15 ~ 20 日齢マウスから細胞を単離し, 細胞外灌流液には通常, 室温 (22 ~ 24 °C) 下で酸素通気 10mM グルコース添加標準液を, 虚血実験には 0mM グルコースあるいは窒素通気 2mM $Na_2S_2O_8$ 添加の無酸素 (< 1torr) 液を用いた。nystatin 穿孔 whole-cell patch にて膜電位記録を, inside-out patch にて単一チャネル電流記録を行った。

結果: 膜電位は 0mM グルコース液 (- 10.0 ± 1.1mV, n = 7) あるいは無酸素液 (- 9.6 ± 1.3mV, n = 11) により過分極した。この過分極は tolbutamide (0.1mM) により速やかに回復し, diazoxide (0.3mM) により再び過分極した。単一チャネル電流は ATP による抑制 (IC_{50} = 12.0 μM, n = 4 ~ 8), 内向き整流性 (内向き 76pS, n = 4 ~ 7) を認め, 開口確率は 0.5mM tolbutamide により減少, 0.5mM diazoxide により増加した。

結論: 黒質網様部神経細胞の K_{ATP} チャネルは臍細胞型 (SUR1/Kir6.2) の特性を有し, 虚血時の膜電位変化に重要な役割を果たすことが示唆された。

24. マウス海馬 CA1 ニューロンのシナプスの可塑性に対するガングリオシドの修飾効果

五十嵐浩太郎, 金子健也, 佐々木寛, 藤井 聡, 伊藤憲一, 加藤宏司 (山形大・医・第二生理)

ガングリオシドは, 特に神経の軸索終末やシナプス後部膜に豊富に存在しており, 神経細胞の増殖やシナプス形成に関係していること, さらに GM1, GQ1b はシナプス長期増強現象に促進効果があることが知られている。今回, マウス海馬 CA1 ニューロンで次の 3 つのシナプスの可塑性について, 1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase

(GM2/GD2 synthase) gene のトランスジェニックマウス (TG) と野生型マウス (Wild) で比較した。1) 短時間の高頻度 (テタヌス刺激, 100 Hz, 100 発) で誘導される長期増強現象 (long-term potentiation, LTP), 2) 低頻度刺激 (1 Hz, 200 発, 20 分おきに 3 回) で誘導される長期抑圧現象 (long-term depression, LTD), 3) 低頻度刺激を与えて LTP をもとに戻す現象 (脱長期増強現象, depotentiation)。その結果, TG では Wild に比較して LTP は有意に小さく, LTD には有意差がなく, depotentiation は有意に起こりやすかった。この結果からガングリオシドはシナプスの可塑性に対し修飾効果があると結論した。

25. ニコチン性 ACh 受容体によるシナプス機能のモジュレーション: 小脳プルキンエ細胞をモデルにした解析

河 和善¹, 鎌田真希² (¹東北大・院・医学系研究科・生体情報学, ²CREST・科学技術振興事業団)

小脳プルキンエ細胞への主な皮質由来入力にはグルタミン酸性の興奮系 (= 顆粒細胞平行繊維系) と GABA 性の抑制系 (= バスケット細胞系) がある。新生ラットより小脳切片 (6 ~ 10 days, 厚み 200 μm) を作成し, 切片内のプルキンエ細胞よりパッチ電極で whole cell の電流記録を行なった。膜電位を - 40mV にすると, 内向きと外向きの自発性シナプス電流が記録され, 前者はグルタミン酸性, 後者は GABA 性と同定された。これらは著しい生後発達を示した。すなわち生後 5 日では主に低頻度のグルタミン酸性入力が見出され, やがて GABA 性の入力に加わり, ともに出現頻度が増し, 10 日令を過ぎると GABA 性が主となりグルタミン酸性入力は目立たなくなった。この時期 (生後 6 日 ~ 10 日) の小脳プルキンエ細胞に低濃度の ACh を急速灌流投与すると, これらの自発性シナプス電流の出現頻度は直ちに顕著に増加した。この ACh の促進作用は, ニコチン性受容体が顆粒細胞およびバスケット細胞に発現している為である。ACh の促進作用は脳の成熟とともに弱くなり, 16 日令以降ではほぼ消失した。新しい様式のシナプス機能モジュレーションとして注目したい。