

## 第47回中部日本生理学会

会 期：平成12年10月13日（金）～14日（土）  
 会 場：財団法人 石川県青年会館  
 当番幹事：金沢医科大学・生理学 小野田法彦，今西 愿  
 演 題 数：40題（口演のみ，発表10分・討論5分）  
 参 加 者：109名（懇親会69名）

会場は卯辰山の麓の小高い所にあり，金沢市街の美しい眺望の中，時間いっぱいまで活発な質疑応答が行われた。遠方（静岡など）からの参加もあり，また学部学生（名古屋大学）の発表もあるなど，活気あふれる会であった。

なお，第48回中部日本生理学会の当番幹事には，名古屋大学医学部・生理学教室（久場健司教授，曾我部正博教授）を満場一致で推薦した。

（事務局：倉田康孝）

### 1. カエル運動神経終末でのCa<sup>2+</sup>チャンネルとリアノジン受容体及びそのプライミング分子との連関機構

曾我聡子，秋田天平，蜂須賀淳一，成田和彦，久場健司（名古屋大学・第一生理）

カエル運動神経終末内のCa<sup>2+</sup>誘起性Ca<sup>2+</sup>遊離（CICR）機構は，頻回のCa<sup>2+</sup>流入による緩徐なプライミング（活性化準備）後，活性化され，伝達物質の開口放出を顕著に促進する。本実験では，CICRのプライミングと活性化に関わる細胞膜Ca<sup>2+</sup>チャンネル，リアノジン受容体およびプライミング関与分子との空間的關係を調べた。カエル胸皮筋の支配神経の断端より蛍光Ca<sup>2+</sup>指示薬を負荷し，神経刺激による神経終末内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を測定した。50 Hz 15発の短い刺激によるCa<sup>2+</sup>濃度変化をCa<sup>2+</sup>流入の変化とし，50 Hz 15秒間と1 Hz 5秒間の繰り返し刺激により発生し，ERのCa<sup>2+</sup>ポンプ阻害剤Thapsigarginによって消失する緩徐なCa<sup>2+</sup>濃度の成分をCICRの変化とし，外液Ca<sup>2+</sup>濃度の変化（単一Ca<sup>2+</sup>チャンネルCa<sup>2+</sup>流入の変化）と細胞膜Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤-ConotoxinGVIA（チャンネル密度の減少）の効果を比較した。外液Ca<sup>2+</sup>の減少により，CICRのピーク時間は顕著に延長するのに対し，CICRの大きさはCa<sup>2+</sup>濃度が1/8以下にならないと顕著に減少しなかった。一方，Ca<sup>2+</sup>チャンネル密度とCICRの大きさはほぼ比例した。従って，細胞膜Ca<sup>2+</sup>チャンネルとリアノジン受容体は非常に近接して存在するのに対し，プライミング分子は少し離れた位置にあることが示唆される。

### 2. ウシガエル交感神経節シナプスの長期増強におけるシナプス前終末内Ca<sup>2+</sup>遊離の役割

叢 雅琳，徳納博幸，竹内晋平，久場健司（名古屋大学・第一生理）

ウシガエル交感神経節のニコチン性シナプスでは，節前繊維の条件刺激により，シナプス前及び後性の長期増強（LTP）が発生する。本研究では，シナプス前性のLTPに細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離が関与するかどうかを検討した。低Ca<sup>2+</sup>高Mg<sup>2+</sup>溶液中で細胞内記録した興奮性シナプス後電位（EPSP）の振幅及び量子数は，シナプス節前繊維の20Hz，4分間の長い条件刺激により数時間にわたり促進された。この時，50Hz，5発の反覆刺激により起こした短期促進は，不変であった。このLTPは，細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵オーガネラのCa<sup>2+</sup>ポンプ阻害剤であるThapsigargin（全てのシナプスで）とRyanodine受容体の活性化剤でIP3受容体の阻害剤でもあるCaffeine（多くの例で）により抑制されたが，Ryanodine受容体の阻害剤であるRyanodineでは抑制されなかった。又，Oregon Green BAPTA-1の蛍光変化により測定した短いテタヌスにより誘起したシナプス前終末の[Ca<sup>2+</sup>]上昇は，長い条件刺激により数時間に亘り促進された。この[Ca<sup>2+</sup>]上昇の促進はThapsigarginにより抑制された。従って，ウシガエル交感神経節シナプスで，シナプス前終末でのCa<sup>2+</sup>流入により活性化される細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離がシナプス前性のLTPの発生に関与し，このCa<sup>2+</sup>遊離はIP3受容体の活性化による可能性が示唆される。

### 3. カエル運動神経終末での細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇の処理機構

鈴木慎一<sup>1</sup>，小山内実<sup>2</sup>，光本拓也<sup>3</sup>，秋田天平<sup>1</sup>，成田和彦<sup>4</sup>，鈴木直哉<sup>5</sup>，木島博正<sup>5</sup>，久場健司<sup>1</sup>（<sup>1</sup>名大医学部第一生理，<sup>2</sup>東京医科歯科大薬理，<sup>3</sup>佐賀医大生理，<sup>4</sup>川崎医大

生理, <sup>5</sup>名大理学部物理学科)

忠実度の高いシナプス伝達には, シナプス前終末でのインパルスによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の効率良い処理機構が必須であり, シナプスの短期可塑性の制御においても重要な役割をする。カエル運動神経終末に 50Hz 10 ~ 100 回の刺激を与えて発生する  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の減衰は, 拡散より早い速度である 30 ~ 100m 秒の時定数と数秒と数 10 秒の三つの成分よりなることが解っている。

本実験では, 細胞膜での  $\text{Ca}^{2+}$  ポンプと  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換による  $\text{Ca}^{2+}$  排出と小胞体及びミトコンドリアでの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを阻害剤により抑制し, どの  $\text{Ca}^{2+}$  機構がどの  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の減衰成分に関与するかを調べた。50Hz, 10 ~ 100 回の刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の減衰の最も速い相は, ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み阻害により顕著に延長し, 速い減衰成分の寄与が小さくなった。同様の効果は, 細胞膜の  $\text{Ca}^{2+}$  輸送阻害により見られたが, その効果は僅かであった。また, ミトコンドリアの Clonazepam による  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換阻害により, 最も速い  $\text{Ca}^{2+}$  減衰相の延長と共に最も遅い相の抑制が見られた。この結果から, シナプス前終末のミトコンドリアは, 高頻度興奮時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  処理に主要な役割を果たし,  $\text{Ca}^{2+}$  の再放出により刺激終了後の  $\text{Ca}^{2+}$  レベルを高く維持する働きをすることが示唆される。

#### 4. マウス小脳登上線維 プルキンエ細胞シナプス伝達の生後発達にともなう変化

橋本浩一<sup>1</sup>, 狩野正伸<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>金沢大学医学部・第二生理, <sup>2</sup>CREST)

幼若な小脳プルキンエ細胞は複数の登上線維により多重支配されているが, 成熟にともないほとんどの細胞が一本の登上線維により支配されるようになる。今回, シナプス伝達特性にも機能的変化がみられるかを, 発達期マウス小脳において日齢をおって検討した。生後 2 ~ 3 日では, 複数の登上線維の強さはほぼ均一であり, プルキンエ細胞にほぼ同じ大きさの EPSC を発生させた。生後 3 ~ 10 日にかけて, 登上線維間の EPSC 振幅の不均一性が増大し, 大きな EPSC を生じる一本の強い登上線維と, それ以外の小さな EPSC を生じる弱い登上線維とに分化した。生後 10 日前後で大きな振幅の EPSC と小さな振幅の EPSC に対する低親和性 AMPA 受容体阻害剤の PDA の効果を比較した結果, 大きな EPSC は小さな EPSC に比べて阻害効果が弱く, 強い登上線維のシナプス間隙の伝達物質濃度が相対的に高いことが考えられた。強い登上線維シナプスは機能的に成熟しているが, 弱い登上線維シナプスは未熟なままであることが示唆された。

#### 5. 細胞外カルシウムによる代謝型グルタミン酸受容体の機能修飾

田端俊英, 狩野方伸 (金沢大学医学部・第二生理)

代謝型グルタミン酸受容体 (mGluRs) は多くの中枢ニューロンに発現し, 遅いシナプス後電位の発生やシナプス可塑性の誘導に関与している。最近, 細胞外カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が強制発現された mGluRs を活性化し, また mGluRs のグルタミン酸反応性を修飾することが報告された。本研究では, mGluR1 を豊富に発現する培養マウス小脳プルキンエ細胞をモデルとして, 中枢ニューロンに自然発現している mGluRs に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の作用を検討した。

2mM の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する状態では, グループ I mGluR 選択的アゴニスト (RS)-3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) によって誘発された内向き陽イオン電流が増強された。また 2mM の  $\text{Ca}^{2+}$  が, 内向き電流の作動 DHPG 濃度域を拡大した。増強作用は mGluR によって仲介されるシナプス可塑性などを促進していると考えられる。作動濃度域の拡大効果は mGluR によって仲介される遅いシナプス後電位に特徴的な広い入力ダイナミックレンジの確保に役立っていると考えられる。さらに  $\text{Ca}^{2+}$  による作動濃度域拡大のメカニズムを実験的・理論的に探索した。

#### 6. 前庭半規管膨大部頂 (クブラ) の構造と機能的役割

時々輪浩<sup>1</sup>, 渡邊暢浩<sup>2</sup>, 服部輝昭<sup>3</sup>, 松田太志<sup>2</sup>, 羽柴基之<sup>2,4</sup>, 水野義雄<sup>5</sup>, 新藤雅子<sup>5</sup>, 渡邊 悟<sup>5,6</sup> (<sup>1</sup>愛知県看護大, <sup>2</sup>名古屋大・医, <sup>3</sup>海南病院・耳鼻科, <sup>4</sup>名古屋第二日赤, <sup>5</sup>大同工大, <sup>6</sup>大同産業医研)

前庭半規管系の頭部回転感受機構を成ハトで調べた。ケタール麻酔した成ハトの頭部を固定し, 水平半規管の膜性半規管と膨大部を露出した。半規管内に外径 160  $\mu\text{m}$  の極微小管を刺入し, エバンスブルーを溶解したハト内リンパ組成液を注入してクブラを加圧し, 同液がクブラを通過する状況を手術用顕微鏡で観察し, ビデオテープに記録した。急速な加圧では, 比較的高い圧で突然通過が始まりクブラの破壊を思わせたが, 極く緩徐な加圧では, 明確な圧の上昇が無いまま通過するのが観察された。そこで, このときの通過部位を確認するため, デキストラン誘導体磁性酸化鉄微粒子複合体 (DM: 大きさ 10nm 径) を含む磁性流体を, 圧の変動が生じない程度の量だけ半規管内に注入し, 対側頭部に置いた磁石でクブラの方向へ牽引流動させたのち, DM の移動位置を Berlin Blue 法で検出した。その結果, DM が膨大部稜の有毛細胞表面に接して感覚毛の間に検出され, このことから, 頭部回転時の相対的な内リンパの流れがクブラ基底部を通過し, 感覚毛を直接撓める可能性が推測された。

## 7. 加速度負荷環境下での自律神経応答計測 (その1) 皮膚自律神経応答計測法の改良と小型化

長岡俊治<sup>1</sup>, 野村裕子<sup>1</sup>, 伊藤康宏<sup>1</sup>, 水野義樹<sup>1</sup>, 畑 忠善<sup>2</sup> (藤田保健衛生大学・衛生学部,<sup>1</sup>生理,<sup>2</sup>臨床病理)

航空機内や宇宙環境下での3次元的な加速度変動場は人体にさまざまな影響を与えるが,短期的には生理的ストレスとなる場合が多く,その影響は自律神経系を介して末梢の血管収縮,皮膚電気反応,発汗などとして測定が可能である.この研究は,これらの反応から重力依存性感覚入力と自律神経応答との関係は無侵襲な測定法で調べることが目的であるが,今回はこの中で皮膚自律神経応答(SSR)の測定法の改善とその試用結果について報告する.SSRは,GSRあるいはSPRとも呼ばれて,精神性発汗などと同相であることが古くから知られているが,最近では皮膚からの水分蒸散の経時的測定やマイクロニューログラフイーによる皮膚交感神経活動の直接的計測も有効であることが報告されている.これまで皮膚電気活動の測定は比較的大きな分極電極を用い,増幅も極めて狭帯域アンプを用いて行うのが一般的であったため測定値の安定性や定量性に乏しいとされてきた.そこでわれわれは計測アンプを改良し,周波数応答帯のより広いものとし,また,皮膚抵抗レベルとその変動を同時計測する工夫を行った.電極も安定性の良い銀-塩化銀系の不分極電極とし面積の微小化を図ることにより,小面積の皮膚(数mm<sup>2</sup>程度)から応答をピックアップできるようにした.これにより,指先部などでの接近した複数部位からの応答を発汗などと同時に測定を行うことが可能となった.試作したアンプを用い健康成人被験者を対象として電気刺激,音刺激,加速度刺激などにより生じる手掌部や指先部の小面積でのSSR計測について,末梢血流変化,心拍ゆらぎ,発汗の連続蒸散測定などと同時計測しその有効性を検討した.

## 8. 慢性炎症モデルラットの皮膚痛覚線維の熱反応に対するノルアドレナリンの効果

佐藤 純, 矢島弘毅<sup>1</sup>, 水村和枝 (名古屋大学・環境医学研究所・神経性調節分野,<sup>1</sup>医学部・整形外科)

病態時にみられる痛覚系に対する交感神経系の促進機構には不明な点が多い.そこで皮膚痛覚線維活動に対するノルアドレナリン(NA)の効果をも慢性炎症ラットと健常ラットで比較した.慢性炎症モデルは尾部にフロイント完全アジュバントを接種し2~3週後,全身性慢性炎症を惹起させた雄性Lewisラット(ADJラット)を用いた.麻酔下で取り出した伏在神経・皮膚標本を用いて皮膚ポリマー受容器の単一神経活動を導出し,受容野に10分間隔でランプ状の輻射熱刺激を与えた.3~4回の繰り返しの

熱刺激を行った後,健常群では30%(3/10),ADJ群では67%(4/6)のユニットがNA(10 $\mu$ M,5分間)に反応した.その後の熱反応は健常群では87%に減弱し,ADJ群では167%に増強した.熱反応閾値はADJ群のほうが健常群よりも平均で約4.3 低く,NA後はADJ群でのみ1.2 低下した.以上の結果から,(1)慢性炎症状態では繰り返し熱刺激後のNAに対する反応性が健常よりも高い,(2)健常群と異なりNAは熱反応の増強と閾値の低下を引き起こすことが明らかとなった.これらの変化は交感神経興奮時に慢性炎症の疼痛が増悪する機構の一つであると推定される.

## 9. 海馬スライス無酸素・無グルコース負荷に対するメラトニンの細胞保護効果について

内田勝久, 岡部明仁, 鮫島道和, 福田敦夫 (浜松医科大学・生理学第一講座)

海馬CA1領域の錐体細胞は虚血に対して抵抗性が弱く,ごく短時間の虚血によっても,遅発性神経細胞死を引き起こす.この原因はまだ明確ではないが,虚血再還流後の細胞のexcitotoxicityに関係する活性酸素などのフリーラジカルの発生が関与していると考えられている.松果体ホルモン「メラトニン」は,生体内に存在する抗酸化剤のうちでも強力な抗酸化作用,ラジカル消去作用を持つ物質の一つであることが近年言われてきている.したがってメラトニンが,虚血後に誘導されるexcitotoxicityを抑制する効果を有する可能性が考えられる.今回メラトニンの虚血に対する細胞保護作用について,海馬スライスを用いてCA1領域錐体細胞のシナプス応答を対象に電気生理学的に検討した.その結果,無酸素・無グルコース負荷によりシナプス応答が消失する時間及び消失の程度については,メラトニン投与によっても変化が見られなかった.しかし負荷後の反応回復においては,対照群と比べて,回復に要する時間,回復する割合に改善が見られた.今回の結果は虚血に対し,メラトニンが細胞保護効果を有する可能性を示唆している.

## 10. 胎生期性ホルモン環境の実験的変化による線条体障害性の検討

最上美保子<sup>1</sup>, 飛田秀樹<sup>2</sup>, 郡健二郎<sup>1</sup>, 西野仁雄<sup>2</sup> (名古屋市立大学・<sup>1</sup>泌尿器科学,<sup>2</sup>第二生理)

脳の性分化に重要な胎生後期にホルモン環境の変化を受けた成熟ラットが3-ニトロプロピオン酸(3-NPA)による線条体障害に性差を示すか検討した.E17~20にアンドロゲンレセプター(AR)拮抗薬を投与しテストステロンの作用を抑制した群,E18~20にアロマトマーゼ(Arom)

阻害剤を投与しエストロジオール産生を阻害した群において、成熟後3-NPAを投与し線条体障害を組織学的に検討した。コントロール群では3-NPA(20mg/kg, s.c)を投与すると投与二日目には雄ラットの約半数にHuntington舞踏病様の異常運動(paddling, rolling)を認め、組織学的に外側線条体領域に特異的なIgG漏出とGFAP染色性の低下が観察される。これに対し雌では運動障害・組織変化は認められない。AR拮抗薬投与では雄の異常運動の発症率が低下した。一方Arom阻害剤投与では雄の発症率が上昇し、本来症状の出ない雌で約80%に運動障害を認めた。発症した雌ラットでは外側線条体領域に上述の組織学的変化が認められた。以上より胎生期AR拮抗薬投与は成熟後の3-NPA細胞障害性に影響を与え雄反応性が雌化し、Arom阻害剤投与では雌反応性が雄化する可能性が示唆された。

### 11. 運動負荷に伴うtissue plasminogen activator (tPA) 活性発現のplasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) による調節機構

浦野哲盟<sup>1</sup>, 井原勇人<sup>1</sup>, 高田由美子<sup>2</sup>, 高田明和<sup>1</sup>(浜松医科大学・<sup>1</sup>第2生理, <sup>2</sup>基礎看護)

はじめに: 血管内線溶活性はtPAとPAI-1により制御されている。運動負荷に伴って放出されるtPAの活性発現に及ぼすPAI-1の影響を検討した。

方法: 13名の男性volunteer(22~24歳)にergometerで漸増する負荷をかけ、運動前、無酸素運動閾値、運動終了時に、種々formのtPA及びPAI-1を測定した。

結果: (1) 血中カテコラミン量の増加と一致してmass tPAは増加した。(2) total PAI-1は変化せず、tPA-PAI-1 complexが増加し、free PAI-1が減少した。(3) tPA活性は、計算で得られたfree tPA量とよく相関し、線溶活性と共に増加した。またこれらの活性の増強度は、安静時のPAI-1量と負の相関を示した。

考察: 運動負荷に伴い放出されたtPAは速やかにPAI-1と複合体を形成し、一部分が活性型free tPAとして存在した。その量は安静時のPAI-1量によって大きく影響された。

### 12. 下半身陰圧下でのhead-down tiltにおいて前庭反射が筋交感神経活動に与える影響

川ノ口潤<sup>1</sup>, 傳 琦<sup>1</sup>, 崔 建<sup>1</sup>, 新美由紀<sup>1</sup>, 神谷厚範<sup>1</sup>, 道上大策<sup>1</sup>, 岩瀬 敏<sup>1</sup>, 間野忠明<sup>2</sup>(<sup>1</sup>名古屋大学・環境医学研究所・自律神経, <sup>2</sup>東海中央病院)

ヒトにおいては、体位変換すると心肺圧受容器反射により筋交感神経活動(MSNA)を増減させ、末梢血管抵抗

を調節することにより、全身血圧を維持する。一方、直線加速度負荷による耳石刺激によりMSNAには変化が生じることから、前庭自律神経反射もMSNAに変化を及ぼす重要な要因となっている。ヒトをhead-down tilt(HDT)するとMSNAは抑制されるが、体液移動による心肺圧受容器反射によるものなのか、耳石への重力加速度の入力変化によるものなのか明らかでない。下半身陰圧負荷(LBNP)により体液移動を阻害した状態で、耳石を刺激するためにHDTを負荷し、MSNA、心拍数、血圧の変化を検討した。健康成人男性9名(年齢: 20±1歳, 身長: 170±6cm, 体重: 62±2kg)を被験者とした。MSNAは脛骨神経から微小神経電図法により記録し、心拍数、胸腔内液体量(ITF, インピーダンス法)、血圧(トノメトリ法)を同時測定した。30分以上臥位を保ち、ITFを安定させた後、-10mmHgのLBNPを負荷した。ITFを、臥位の値から変化しないように6~8.5°のHDTを行い、臥位の状態と比較した。その結果、LBNPとHDTの同時負荷により心拍数、血圧には変化が観察されなかったが、MSNAは抑制された。HDTによるMSNAの抑制は、体液移動による心肺圧受容器反射ではなく、耳石への重力加速度入力の変化によるものと推測された。

### 13. 肺循環と肝循環の血管収縮部位の差異 イヌ摘出灌流標本における検討

芝本利重, 小山西三(信州大学・医学部・第二生理)

肺動脈と門脈はともに低圧系であり、肺と肝臓はともに消化管から発生し、解剖学的にも栄養動脈の存在と小葉構造も類似している。しかし、その血管反応性の差異は不明である。今回、アナフィラキシー反応とそれに関連する炎症性血管作動性物質、さらにはノルエピネフリンの肺と肝臓の血管収縮部位を比較検討した。

雑種成犬の左肺下葉と肝臓をそれぞれ肺動脈と門脈からヘパリン加自家血により定圧灌流を行った。なお、肝臓の一部は肝動脈も灌流した。アナフィラキシー血管反応はブタ蛔虫抗原投与により惹起した。炎症性血管作動性物質はヒスタミン、トロンボキサンA2アナログ、血小板活性化因子を検討した。毛細管圧は肺と肝ともdouble occlusion pressureあるいはtriple occlusion pressureにより測定した。それよりpre-とpostcapillary resistanceを算出し、いずれの部位が優位に収縮するか比較した。

アナフィラキシー反応と各炎症性物質の血管収縮反応は肝も肺も同様にpostcapillaryが優位であり、臓器重量(血液量)を増加させた。一方、ノルエピネフリンの収縮反応は肺はpostcapillaryが優位で、肝臓はprecapillaryが優位であり異なっていた。

#### 14. マウス盲腸におけるプロピオン酸吸収機序の解明

川俣幸一, 鈴木裕一 (静岡県立大学・生活健康科学研究科・人体生理学)

大腸では腸内発酵により大量の短鎖脂肪酸が生成されている。短鎖脂肪酸は速やかに吸収される事は知られているが、管腔側膜における種々の吸収機序を明確に分類した報告は無い。今回、我々は短鎖脂肪酸の吸収機序を明らかにする為、マウス盲腸を Ussing chamber に装着し短鎖脂肪酸吸収フラックスを HPLC を用いて分析した。短鎖脂肪酸はプロピオン酸を採用した。吸収フラックスは血液側の  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  に大きく依存した。電位依存性を示さなかった。炭酸脱水酵素阻害剤 Acetazolamide 投与により大きく低下した。 $\text{H}^+$ -モノカルボン酸共輸送体阻害剤 *a*-cyano-4-hydroxy cinnamate は管腔側投与よりも漿膜側投与で著明な効果を示した。これらの事はマウス盲腸においてプロピオン酸は主として血液側  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  に依存して吸収される成分 (おそらく propionate $^-/\text{HCO}_3^-$  交換輸送体) と、単純拡散により吸収される成分と二種類存在する事を示唆している。また  $\text{H}^+$ -モノカルボン酸共輸送体のプロピオン酸吸収への貢献度は比較的低いと思われる。

#### 15. マウス小腸消化管の Slow wave : 培養組織小塊での検討

中山晋介, 鳥橋茂子 (名古屋大学大学院・医学専攻・細胞生理学, 分子細胞学)

消化管運動は, Slow wave と呼ばれる緩徐な自発性の膜電位変動によって駆動される。最近, 癌原遺伝子 *c-kit* を発現する細胞群がペースメーカーである可能性が示されているが, 未だ結論には至っていない。これは単離細胞においては, Slow wave の発生・観察が, 難しいことに起因すると考えられる。そこで本研究では, Slow wave の発生を容易に再現できる消化管の培養組織小塊 (細胞塊) を腸管ペースメーカー機構のモデルとして開発した。

マウス小腸から, 筋層 (筋層間神経叢含む) を摘出して細切した後, 酵素処理によって作成した細胞塊の培養を行った。免疫抗体により, 細胞小塊中には平滑筋, 神経細胞の他に, 抗 *c-kit* 抗体陽性細胞もネットワーク状の形態で存在する事を確かめた。この細胞小塊の辺縁にあり, カパーガラスに定着した細胞から, whole-cell voltage clamp 法を用いて電流記録を行ったところ, 規則正しい内向き電流のオシレーション (周波数: 約 14 ~ 20/分, 35  $\mu\text{s}$ ) が観察された。このオシレーション周期は, 細胞小塊の大きさには依存しなかったが, 温度感受性は強く, 室温では大きく影響された。一方, 電位依存性 Na チャネルや Ca チャネルの阻害剤である TTX や nifedipine では, その周期

は影響されなかった。また, Ni や Cd は 100  $\mu\text{M}$  程度の濃度で抑制した。

#### 16. ウシ毛様体平滑筋細胞における非選択性陽イオンチャネルのムスカリン受容体刺激による活性化の信号伝達経路

高井 章<sup>1</sup>, 高井佳子<sup>2</sup>, 三宅養三<sup>2</sup> (名古屋大・院・医・<sup>1</sup>細胞科学・分子動態, <sup>2</sup>眼科)

目的: ウシ毛様体平滑筋ではムスカリン  $M_3$  受容体の刺激により一種の非選択性陽イオンチャネル (NSCC) の開口による電流応答が観察される。今回, 我々はこのチャネルの特性をノイズ解析の手法により調べた。また, ムスカリン受容体経路で調節される NSCC を形成することで注目されている *trp* チャネル遺伝子の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

方法: 単離ウシ毛様体筋細胞に全細胞モードの膜電位固定法を適用し電流を記録した。灌流液には 10 mM-HEPES (pH 7.4) を含む正常液を用いた。電極は  $\text{K}^+$  を含まず, 100 mM Cs aspartate, 5 mM-BAPTA ( $[\text{Ca}^{2+}] = 70 \text{ nM}$ ) および 200  $\mu\text{M}$ -GTP (pH 7.0) を含む液で満たした。実験は全て 30  $^\circ\text{C}$  で行った。RT-PCR に使用したプライマ対は, ヒトまたはマウスで報告されている 7 種類の *trp* (*trp1-trp7*) 遺伝子の塩基配列をもとに, チャネル孔形成部とされる 100 ~ 130 アミノ酸配列に当たる部位の全域を挟むように設計した。

結果と考察: 膜電位を -50 mV に保持して, CCh (2  $\mu\text{M}$ ) を灌流液中に投与すると, 著明なノイズの増加を伴う内向き電流が観察された。非定常分散分析の結果から, この電流応答には単位コンダクタンスが比較的大きい (40 pS) ものと非常に小さい (200 fS) ものと, 少なくとも 2 種類の NSCC ( $\text{NSCC}_L$  と  $\text{NSCC}_S$ ) の開口が開与することが示唆された。 $\text{NSCC}_L$  に由来する電流ノイズのパワースペクトルには, 時定数 3 ms と 15 ms の 2 つの Lorentz 成分が認められ, その開閉には少なくとも 3 つの状態間の遷移が開与していることが示唆された。電極内の GTP を GTP S で置換すると, CCh 投与なしでも散発的に  $\text{NSCC}_L$  が開口するのが観察された。また灌流液中に thapsigargin を投与してもチャネル開口は見られず, 1  $\mu\text{M}$  以上の濃度ではかえって CCh に対する応答の不可逆的な抑制が見られた。 $M_3$  受容体刺激により  $\text{NSCC}_L$  や  $\text{NSCC}_S$  が開口する際の信号伝達は, いわゆる容量依存性の経路ではなく, 何らかの G 蛋白を介する経路を介するものであるものと推定される。一方, RT-PCR 法による cDNA の検索により, ヒト *trp3* および *trp6* にきわめて類似した *trp* が多く発現していることが明らかになった。電気生理学的に捉えられたチャネルとこれ

らの遺伝子との関連に興味を持たれる。

### 17. 誘発筋電位の経時的变化からみたAChのリサイクル過程

浦本 勲, 渡辺貴美, 戸塚 武 (愛知県コロニー研究所・生理)

神経筋接合部においては, 放出された過剰なアセチルコリン (ACh) は, コリンエステラーゼによって速やかに分解され, 終末に吸収されたコリンは, 放出可能な ACh として再利用される。この ACh のリサイクル過程を誘発筋電位法で評価し, この過程のもつ特質を明らかにした。実験は, 0.5 Hz で与えた 10 コ 1 組の刺激に対する誘発筋電位を, ネオスチグミン投与前後にラット腓腹筋から導出し, その経時的变化を調べた。ネオスチグミン存在下では, 最初の電位はコントロールレベルであるが, 2 コ目には強く抑圧された。その後ゆっくり回復し, 10 コ目にはほぼコントロールレベルになった。2 分以上の間隔で与えた組刺激では, 同じパターンが繰り返し観察された。1 分後の刺激に対しては対照的なパターンを呈し, 2 コ目の電位も余り抑圧されなかった。一つの可能性として, 次のように推測した: 1 コ目の刺激によって多量の ACh が放出され, ネオスチグミン存在下では, ACh のリサイクル過程がうまく機能せず, 放出可能な ACh プールはほとんど枯渇状態になるが, リサイクル過程が活性化し, ACh がだんだんと補充されるのだろう。しかも, この活性化は, 1 分間程度は持続するが, 2 分も経過すれば消滅するもので, 短期記憶的に調節される特質であろう。

### 18. 筋ジストロフィー症 dy マウス: 筋原線維の縦裂 / 分枝

戸塚 武<sup>1</sup>, 渡辺貴美<sup>1</sup>, 佐久間邦弘<sup>2</sup>, 浦本 勲<sup>3</sup> (愛知県コロニー・研究所・<sup>1</sup>生理二, <sup>2</sup>生理三, <sup>3</sup>生理一)

筋ジストロフィー症 (MD) dy マウスの初期病態は, 骨格筋の変性 (通説) ではなく成熟成長障害で, 筋病変と症状の悪化に骨の伸長成長が関係しているらしいこと (筋成長障害説; 一歩進めた筋 骨不均衡説), その証拠に, 小人症を合併させると MD の発症を予防できることなどを報告してきた。dy 筋の成熟成長障害の機構の解明が, MD の病因解明と治療法開発につながると期待される。

さて, 骨格筋の筋線維 (筋細胞は多核の細胞体で線形をしているので筋線維と呼ばれる) の肥大成長機構の一つとして, 筋線維内で収縮を担う筋原線維が縦裂して増えることが考えられている。しかし, 筋原線維は独立した構造体で縦裂 / 分枝しないと思っている専門家も多い。因に, 20 数年前に Goldspink たちは筋原線維の縦裂の開始は筋節の

構造と関係していると報告している。今回, 正常成獣マウス骨格筋を電顕で観察し, 筋原線維は, 細胞膜で隔離された細胞のような独立した構造体ではないことを改めて認識し, 筋原線維の縦裂が普段の現象であり, 局所的縦裂や, 筋節内でのスジ違いの縦裂も起こっていることが分かった。MD 罹患や老化で活力が落ちた筋では, 筋節の縦裂は病変を悪化させることも予想される。縦裂の機序と, 生理的 / 病理的意味を考察する。

### 19. 血管平滑筋収縮における低分子量 G 蛋白質 Rho の関与

桜田惣太郎, 王 焜, 桜井華奈子, 岡本宏之, 多久和典子, 杉本直俊, 多久和 陽 (金沢大学・医・第一生理)

興奮性アゴニストによる平滑筋収縮には, 三量体 G 蛋白質  $G_q$  を介したホスホリパーゼ C と細胞膜 Ca チャネルの活性化が重要である。Ca<sup>2+</sup> の上昇により, ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) が活性化され, 分子量 20kD のミオシン軽鎖 (MLC) のリン酸化が生じて収縮が開始する。最近, Ca<sup>2+</sup> による MLCK 活性の調節に加えて, Rho Rho キナーゼ ミオシンホスファターゼ系が重要な MLC リン酸化の調節系であることがわかってきた。すなわち低分子量 G 蛋白質 Rho が活性化されると Rho キナーゼが活性化され, これがミオシンホスファターゼ 130kDa サブユニット (MBS) をリン酸化する。この結果, ミオシンホスファターゼ活性が抑制され, MLC のリン酸化レベルと血管収縮が増強される。しかし, 興奮性アゴニストの Rho 活性化作用については直接的な報告はない。私達は, 活性型 Rho (GTP 結合型 Rho) を定量する方法を確立し, ウサギ大動脈にてアゴニスト刺激による Rho の活性化を検討した。トロンボキサン A<sub>2</sub> アナログ U46619, ノルアドレナリン, ヒスタミン, セロトニン, エンドセリン 1 はいずれも収縮を引き起こし Rho を活性化した。U46619 の Rho 活性化作用は他のアゴニストに比して強かった。アンジオテンシン II, PDBu は収縮を引き起こすものの Rho を活性化しなかった。以上の結果は, 興奮性アゴニストが Rho を活性化し, これが細胞内 Ca<sup>2+</sup> の上昇とともに MLC リン酸化の上昇に関与することを示唆する。Rho 活性化の能力はアゴニスト間で異なり, その機序も異なることが示唆された。

### 20. ヒトチロシン水酸化酵素の活性調節における Arg<sup>37</sup>-Arg<sup>38</sup> の役割

中島 昭, 森 啓至, 金子葉子, 太田 明 (藤田保健衛生大学・医学部・第一生理)

カテコールアミン合成系律速酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) は L - チロシンから L - ドーパへの変換を

触媒し、その酵素活性は生合成されたカテコールアミンによるフィードバック抑制により制御されている。我々はTH分子内のArg<sup>37</sup> Arg<sup>38</sup>配列がこの抑制に重要な役割を果たしていることを昨年の本学会で報告した。今回、この配列がなぜドーパミン抑制にとり重要であるかを検討した。

ヒトTH(1型)N端の2次構造を解析した結果、Arg<sup>37</sup> Arg<sup>38</sup>は2つの $\alpha$ -helix( $\alpha$ -helix 1: 16~29残基、 $\alpha$ -helix 2: 42~59残基)に挟まれたturnに位置しており、しかも活性調節に重要であるとされるリン酸化部位のSer<sup>31</sup>とSer<sup>40</sup>もこのturnに存在することが明かとなった。

そこで、Arg<sup>37</sup> Arg<sup>38</sup>をGlyもしくはGluに置換した変異体を作製してドーパミンによる活性抑制を測定した結果、この抑制はGlyに置換すると低下し、Gluに置換するとさらに低下することが明かとなった。また、変異体遺伝子をAtT-20細胞へ導入後、細胞内のドーパミン蓄積量を測定したところ、wild-typeに比し変異体では蓄積量が有意に増加していた。

Arg<sup>37</sup> Arg<sup>38</sup>の陽性荷電が活性調節に重要であることが明かとなった。また、この陽性荷電とリン酸化されたSerの陰性荷電が活性調節に重要であることが示唆された。

## 21. キンドリングによるラット梨状葉皮質領域におけるNKCC1 mRNAの発現上昇

岡部明仁<sup>1</sup>、大野浩司<sup>2</sup>、佐藤康二<sup>2</sup>、福田敦夫<sup>1</sup>(浜松医科大学・<sup>1</sup>第一生理、<sup>2</sup>第一解剖)

神経細胞内外のCl<sup>-</sup>濃度勾配の変化によりCl<sup>-</sup>をチャージキャリアとするGABAによる抑制作用は大きく変化することが考えられる。我々は、Cl<sup>-</sup>濃度勾配を変化させる因子として、外向きCl<sup>-</sup>トランスポーターのKCC1、KCC2、内向きCl<sup>-</sup>トランスポーターのNKCC1及び電位依存性Cl<sup>-</sup>チャンネルのC1C-2に着目した。そこで、これらトランスポーター及びチャンネルが脳機能に対してどのような役割を果たしているのかを知る目的で、抑制性シナプス伝達の可塑性・病的変化に着目し、神経回路の過剰興奮を呈するてんかんの病態モデルであるキンドリングラット(扁桃体刺激)を実験に用いた。上述の4種類の遺伝子からアンチセンスオリゴプローブをデザインし、これら遺伝子の発現様式を*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。その結果、梨状葉皮質領域においてNKCC1 mRNAの発現量が増加していることが明らかになった。一方、KCC1、KCC2及びC1C-2において、この領域での遺伝子発現における顕著な変化は認められなかった。このことから、キンドリング後の梨状葉皮質領域では、内向きトランスポーターであるNKCC1の発現量が増加し、細胞

内へのCl<sup>-</sup>取り込みが増してCl<sup>-</sup>濃度が上昇し、GABAによる抑制作用が減弱している可能性が示唆された。

## 22. パーキンソン病モデルラットへの移植を目的とするラット胎仔由来神経幹細胞へのチロシン水酸化酵素遺伝子導入

兜玉裕司、馬場広子、飛田秀樹、鄭 且均、西野仁雄(名古屋市立大学・医・第2生理)

自己再生能と多分化能をもつ神経幹細胞をE12.5ラット中脳腹側部より調整し、レトロウイルス(RV)ベクターを用いてチロシン水酸化酵素(TH)遺伝子を導入しパーキンソン病モデルラットへの移植ドナー細胞の開発を試みた。神経幹細胞へのRV感染効率を検討するため、LacZ遺伝子のみを組み込んだRVを*in vitro*で神経幹細胞に感染させた。その結果、遺伝子導入には10<sup>6</sup>cfu/mlという高力価RVが必要であることが分かった。そこでTH遺伝子とLacZ遺伝子を組み込んだ10<sup>6</sup>cfu/mlの高力価RV液を、RV産生細胞の低温培養と培養上清の低温低速遠心濃縮法により調整した。このRVを感染させたNIH3T3細胞では、LacZ遺伝子とTH遺伝子が同時に発現されることをTH及びX-Galの二重染色法により確認した。一方、この感染細胞の培養液中にBH<sub>4</sub>を加えるとL-dopaが産生・放出されることをHPLC法により確認した。また、このTH及びLacZ両遺伝子をもつ高力価RVは神経幹細胞にも効率よく感染することが明らかになった。以上より、高力価RVベクターを開発しTH産生能を持つドナー細胞としての神経幹細胞を調整することが可能となった。

## 23. 視交叉上核での時計遺伝子Per2のmRNAとArg-vasopressin mRNAのmelatoninに対する影響

磯部芳明、西野仁雄(名古屋市立大学、医学部、第2生理)

哺乳動物の生物リズムの中核である視交叉上核(SCN)からの概日リズム情報の出力にArg-vasopressin(AVP)含有神経が関係している。AVP含有神経の活動をAVP peptide、AVP mRNAの変動から検討した。実験にはラットを用い、明暗周期下又は恒暗下飼育のラットの脳からSCNをパンチアウトし、AVP peptideはEIAで、AVP mRNAとPer2(時計遺伝子)のmRNAはRT-PCR法で定量した。SCN中のAVP peptideとAVP mRNAは明暗周期下で明期に各々高値を示し、その頂値出現時刻はAVP peptideの方がmRNAよりも4時間程度先行した。peptideの方がAVP mRNAより前にピークが出現する傾向は自由継続リズム下でも認められた。Per2 mRNAは明期に暗期より高値を示した。メラトニンの腹腔内投与でSCN

中の AVP peptide 含量は減少し、AVP mRNA は投与後 3 時間目までは大きな変動はなかった。Per2 mRNA はメラトニン投与で 3 時間目までは増加した。AVP peptide 減少と Per2 mRNA の増加の因果関係の解明は今後の課題と考える。

#### 24. 高 NaCl 食および高 KCl 食負荷がラット肝臓 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体発現量に及ぼす影響

土谷 庸<sup>1,3</sup>, 中島 茂<sup>2</sup>, 坂野喜子<sup>2</sup>, 鈴木裕一<sup>3</sup>, 森田啓之<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 岐阜大学医学部・第一生理学, <sup>2</sup> 岐阜大学医学部・生化学, <sup>3</sup> 静岡県立大学・大学院・人体生理学 )

我々は、門脈 肝臓領域 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 感受性機構に、bumetanide 感受性 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体が関与していることを報告してきた。本研究では、高 NaCl 食および高 KCl 食負荷が、この Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 感受性機構に及ぼす影響を検討するため、ラットに 4 週間にわたって高 NaCl 食および高 KCl 食を負荷し、肝臓求心神経活動と、肝臓における Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体の mRNA 発現量およびタンパク量の変化を調べた。mRNA 発現量は RT-PCR 法、タンパク発現量は Western blotting 法を用いて半定量化した。高張 NaCl 溶液あるいは等張 KCl 溶液の肝門脈内投与に対し、肝臓求心神経活動は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 濃度依存性に増加した。高 NaCl 食および高 KCl 食ラットにおいては、普通食群に比して、この応答は有意に低下していた。また、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体の mRNA 発現量、タンパク発現量ともに、普通食群に比して高 NaCl 食および高 KCl 食群では、有意に減少した。これらの結果は、高 NaCl 食および高 KCl 食負荷が、ラット Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> 共輸送体発現量を低下させ、肝臓神経を求心路とした Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> 感受性機構の感受性低下を引き起こしている可能性を示唆する。

#### 25. 遺伝子の塩基配列に内在する規則性の生物進化に伴う変化の解析

永井直樹, 桑田一夫, 林 知也, 恵良聖一 ( 岐阜大学医学部・第二生理 )

遺伝子の塩基配列に内在する周期性や自己相似性を検討するために、今回我々は 15 生物種のヘモグロビン 鎖 ( グロビン ) 遺伝子を対象としてフーリエ解析を行い、これらの規則性の生物進化に伴う変化について研究した。まず遺伝子の塩基配列を A, G, T, C の 4 つの塩基からなる「文字列」として捉え、二次元のマップ・パターン解析を行った。その結果、パターンは、イントロン部分よりエクソン部分でその広がり有意に小さく、特にイントロン部分では、生物種がより高等になるに従って一定の方向に変化したことから、進化に伴って、エクソン部分では自然淘

汰が、イントロン部分では何らかの規則性が働いている可能性が示唆された。またモノマー、ダイマー解析により、塩基配列をフーリエ変換し、パワースペクトルを求めた。遺伝子配列の高周波領域 ( 2 ~ 30 塩基対 ( bp ) ) と低周波領域 ( 50 ~ 300 bp ) に観測された周期性は、進化に伴っていずれも増加する傾向が認められたことから、進化に伴って、同義置換の発生や DNA とヒストンとの相互作用の非安定化、そしてクロマチン構造の安定化という変化が生じていることが示唆された。さらに、パワースペクトルのより低周波領域 ( 160 ~ 16000 bp ) における 1/f 解析を行った結果、遺伝子配列に内在する自己相似性も進化に伴って増加する傾向が認められた。これらのことから、遺伝子塩基配列へのフーリエ解析は、複雑な実験を行うことなく、DNA の進化におけるさまざまな情報を取り出すことができる新しい手法であろうと考えられた。

#### 26. 制限給餌による長寿ラットにおける水晶体タンパク質の構造変化に関する研究

中村浩二<sup>1</sup>, 伊藤美武<sup>2</sup>, 鄭 英美<sup>3</sup>, 富田美穂子<sup>1</sup>, 根川常夫<sup>1</sup>, 佐藤秩子<sup>2</sup>, 田内 久<sup>2</sup>, 尾崎幸洋<sup>3</sup>, 恵良聖一<sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 岐阜大・医・第二生理, <sup>2</sup> 愛知医大・加齢研, <sup>3</sup> 関西学院大・理・化学 )

実験的に寿命延長効果が明らかとなっている食餌制限ラットは、老化の機序解明に有効な実験動物として老化研究に多用されている。

今回我々は、そのような系のラット、即ちドンリュウ系ラットの自由摂食群 ( AL 群 ) および 60 % 量のカロリー制限群 ( DR 群 ) に対し、両群の寿命延長効果、体重変化、さらにラマン分光光度計を用いて水晶体タンパク質の構造変化について検討した。

今回の研究においても、従来の報告と同様に DR 群では寿命延長とカロリー制限に見合った体重変化が観測された。しかしラマン測定による水晶体タンパク質の構造変化に関しては、両群間で大きな相違は認められなかった。即ち、水晶体タンパク質の二次構造やチロシン側鎖の微環境は、両群とも体重減少への変曲点 ( 20 カ月齢前後 ) とほぼ一致して変化を認めた。ところで、従来の報告 ( 18 カ月齢までの報告 ) ではこれらの値はほぼ一定であるとされているが、24 カ月齢 ( 長寿ラット ) まで行った今回の研究では、体重減少への変曲点以降の動態について観察できたと思われる。タンパク質の SH, S-S 交換反応に関して、両群とも全ての週齢で SH 基の存在は認められたが、S-S 結合の存在は認められなかった。



## 27. カルバコール刺激による大腸上皮 T84 細胞の形態変化と $\text{Ca}^{2+}$ 動員

眞鍋健一, 出崎克也, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理研・機能協同, CREST・JST)

サイクリック AMP を介して分泌刺激物質として働く VIP によって ( $\text{Cl}^-$  流出による) 細胞収縮が見られることが, ラット大腸腺上皮 (Diener, Pflugers Arch. 1994) やモルモット小腸腺上皮 (O'Brien et al., Pflugers Arch. 1993) において報告されている。今回我々は, ヒト大腸上皮由来の T84 培養細胞を用いて,  $\text{Ca}^{2+}$  を介する分泌刺激物質であるカルバコールによって引き起こされる形態変化について検討した。カルバコールで刺激すると, T84 細胞が収縮し, カルバコール除去後にはゆっくりと回復腫脹する様子が, 高速細胞容積測定により確認された。二光子レーザー顕微鏡を用いても同様の現象が確認された。また, カルバコール刺激時には  $\text{Ca}^{2+}$  が動員されていることが, Fura2 による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで確認された。さらに, カルバコール刺激下での形態変化に対する,  $\text{Cl}^-$  チャネルブロッカーや  $\text{K}^+$  チャネルブロッカーの効果についても検討し, そのメカニズムについて探る。

## 28. 細胞膜直下 $\text{Ca}^{2+}$ 誘起性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離機構による細胞膜興奮性の可塑的制御

秋田天平, 久場健司 (名古屋大・医・第一生理)

我々は培養ウシガエル腰部交感神経節細胞において, 活動電位により細胞膜直下数  $\mu\text{m}$  以内の部位に引き起こされる  $\text{Ca}^{2+}$  誘起性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構 (CICR) について報告してきたが, 今回はそれが活動電位の再分極および後過分極相の時間経過を可塑的に調節する機構について報告する。この細胞における活動電位の再分極相には  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 BK チャネルを介する電流成分が存在するが, その成分は ryanodine・thapsigargin による CICR の抑制により減少し, その結果再分極相の延長が引き起こされた。50Hz の頻回刺激による活動電位に対して細胞膜直下の  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の大きさはその不活性化過程により次第に減少するが, それに伴って一つ一つの活動電位の再分極相は徐々に延長し, その程度は互いに相関した。またこの延長の過程も CICR の抑制により減少した。このことは電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル,  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 BK チャネルおよび ryanodine 受容体の三者が非常に近接して存在し,  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の大きさが直接再分極相の速さを決定していることを意味する。活動電位の後過分極相には  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 SK チャネルを介する電流成分が存在するが, その成分も CICR の抑制により減少した。しかし頻回刺激において後過分極相が増大するにもかかわらず, その CICR 依存性の成分は次第に減少した。このこと

は再分極相の延長に伴う  $\text{Ca}^{2+}$  流入の増加が, 頻回刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  遊離の減少を SK チャネルの活性化に関して補償していることを意味する。従ってこの神経細胞における細胞膜直下  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構は入力の高頻度に応じてその大きさを調節することにより, 膜興奮性を可塑的に調節していると結論される。

## 29. 神経系培養細胞における容積感受性クロライド電流

森信一郎, 森島 繁, 岡田泰伸 (生理研・機能協同, CREST・JST)

神経系培養細胞である分化型 NG108-15 細胞の容積感受性電流を whole-cell voltage clamp 法を用いて調べた。浸透圧性細胞膨張により外向き整流性電流が活性化され, 細胞外  $\text{Cl}^-$  濃度変化に応じてこの電流の逆転電位がシフトした。細胞外の陰イオンを  $\text{Cl}^-$  を  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$  に変化させると同様に逆転電位が移動し, これから計算できる relative permeability は Eisenman's anion selectivity sequence の I 型に分類できた。また,  $\text{Cl}^-$  channel blocker である DIDS, NPPB により抑制を受けた。これらの結果からこの電流は容積感受性  $\text{Cl}^-$  電流と結論された。また, この電流は乳酸アシドーシス溶液投与により急速に抑制された。これまでに未分化型の本細胞でその存在が確認されていた容積感受性  $\text{Cl}^-$  電流の発現が, 神経細胞分化後においても保たれていることが明らかとなり, 本チャネル電流が神経細胞機能を修飾する可能性が示唆された。また, 虚血時の脳内乳酸蓄積や糖尿病など代謝性疾患における乳酸アシドーシスの際の細胞容積調節破綻に, 本チャネル活性抑制の関与が推定された。

## 30. VOLUME-SENSITIVE $\text{Cl}^-$ CURRENTS IN C127 CELLS STABLY TRANSFECTED WITH CFTR

Iskandar ABDULLAEV, Ravshan SABIROV, Katsuya DEZAKI, and Yasunobu OKADA (Department of Cell Physiology, National Institute for Physiological Sciences; and CREST, JST)

In this study, properties of volume-sensitive outwardly rectifying (VSOR)  $\text{Cl}^-$  currents were investigated in murine mammary carcinoma cells stably transfected with CFTR (C127/CFTR) using bovine papilloma virus (BPV) and parental C127i cells with and without BPV transformation. These cells responded to a mild hypotonic challenge with swelling and activation of VSOR  $\text{Cl}^-$  current. The rate of current activation was significantly faster and the steady-state current was around 3 times higher in

C127/CFTR cells than those in control C127i cells. Neither intracellular pH (a determinant of VSOR activity), nor osmotic water permeability (a determinant of cell swelling rate) was affected by CFTR expression. The single-channel conductance was 40% higher in C127/CFTR cells. Surprisingly, properties of VSOR Cl<sup>-</sup> currents were indistinguishable between C127/CFTR and BPV-transformed C127i cells. A possible role of BPV-mediated cell signaling in VSOR Cl<sup>-</sup> channel regulation is currently under investigation.

### 31. 心筋膜電流系に及ぼす高浸透圧外液の効果

小倉敏嗣, 今西 愿 (金沢医科大学・第二生理)

細胞外液の浸透圧上昇が心筋に与える電気生理学的影響を検討する為, 正常の1.5~3倍の高浸透圧タイロド液で表面灌流したモルモット単離心室筋細胞から膜電流を記録した. 高浸透圧環境下(10~20分)では(i)内向き整流K<sup>+</sup>電流の増大, (ii)遅延整流K<sup>+</sup>電流の抑制, (iii)L型Ca<sup>2+</sup>電流の抑制, (iv)Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ポンプ電流の抑制, そして(v)Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>交換電流の増大が観察された. これらの電流変化は主に脱水による細胞内イオン(K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)濃縮に基づくものと考えられ, 高浸透圧環境下で観察されたモルモット右室乳頭筋に於ける静止膜電位の過分極ならびに活動電位持続時間と収縮張力の二相性変化(初期の延長/陽性変力作用とそれに続く短縮/陰性変力作用)の機序を説明し得るものである.

### 32. ラットの前障, 大脳皮質, 視床間の線維結合様式: A multiple tracer study

稲見直子, 澁谷浩司, 山本哲朗 (三重大学・医学部・生理学第二講座)

前障は, 大脳皮質に隣接した薄いシート状の灰白質である. 過去の前障に関する研究は大脳皮質との線維結合に重点がおかれ, 皮質下投射に関する情報は少なく, 前障の機能は未だ不明な点が多い. 従来の研究によると吻側前障は主に運動野と相互的な線維連絡を持つことが知られている. 最近我々の研究室は, ラット吻側前障が隣接眼窩皮質への入力の一部を受け, 発生が同一であることを示唆した (Shibuya H and Yamamoto T (1998) Neuroscience 85 (4): 1037-1049). このような理由から我々は, 吻側前障, 運動皮質及び眼窩皮質に特に注目し, 種々の標識物質 (biotinated dextran, fast blue, fluorogold, fluororuby) を細胞外に注入することにより, 吻側前障と視床, 運動野および眼窩皮質との線維結合を解析し, 吻側前障の機能を推察した. 実験結果より, 吻側前障は運動野及び眼窩皮質

と相互連絡を持ち, 一個の前障神経細胞が同時にこれらの領域へ投射することが明らかとなった. このことより吻側前障は運動機能及び情動機能を統御する重要な役目を担っているのではないかと考えられる.

### 33. NEURONAL ACTIVITIES IN THE ANTERIOR TEMPORAL CORTEX OF MONKEYS DURING A DELAYED MATCHING-TO-SAMPLE TASK BASED ON FACE IDENTIFICATION

Wania C. de Souza, Satoshi Eifuku, Ryoji Tamura, Hisao Nishijo, and Taketoshi Ono (Dept. Physiol., Facult. Med., Toyama Med. Pharmaceu. Univ.)

We recorded single unit activity from the anterior temporal cortex including areas STPa, TEad, TEav, and the perirhinal cortex (PRh) of monkeys during a delayed matching-to-sample task based on the identification of faces (I-DMS task). In the I-DMS task, a sample stimulus was presented after fixation, then test ("match" or "non-match") stimuli followed after a period of inter-stimulus delay. The visual stimuli were digital images of faces of persons that were either unfamiliar or familiar to the monkey. The monkey was required to press a lever when a match stimulus was presented; the sample was the front view (0°) of a person and "match" stimuli consisted of seven images of the person viewed from seven angles (±90°, ±45°, ±22.5°, 0°). Some intervening ("non-match") stimuli were presented until the "match" finally appeared. Also some neutral abstract patterns were used as control. Many face-responsive cells recorded in the areas STPa and TEad showed selectivity depending on the viewing angle of the faces. In particular, some responded best to ±45°. Face-responsive cells recorded in the area TEav and PRh had broad tuning to the viewing angle of the faces. Responses of some cells in these areas showed sensitivity to familiarity or unfamiliarity of faces. The results suggest different functional roles in the identification of faces between the areas STPa and TEad and the areas TEav and PRh.

### 34. 老齢ラットの学習障害に対する紅蔘非サボニン成分の改善効果

上野照子<sup>1</sup>, 鐘 咏梅<sup>1</sup>, 西条寿夫<sup>2</sup>, 小野武年<sup>1</sup> (富山医科大学医学部・<sup>1</sup>第二生理, <sup>2</sup>第一生理)

目的: われわれは, すでに, 紅蔘末が老齢ラットおよび海馬体損傷若齢ラットの学習・記憶障害を改善することを

報告している。本研究では、紅蔘成分である非サボニン分画の学習・記憶機能に対する作用を行動学的に明らかにするため、老齡ラットに非サボニン分画を経口投与して、当教室で開発した場所学習課題における学習成績を解析し、前回報告した老齡ラットに対する紅蔘末の効果と比較・解析した。

実験方法：28～32月齡のFisher344系雄ラットを用いた。まず、ラットの視床下部外側野に脳内自己刺激(ICSS)用電極を埋め込み、ICSSを報酬とするレバー押し行動を7日間訓練した。紅蔘非サボニン分画は、レバー押し訓練5日目より毎日経口投与した。その後、1) DMT (Distance movement task), 2) RRPST (Random reward place search task), および3) PLT (Place learning task)の順で3つの課題を学習させた。DMTでは、ラットが一定の距離を歩行移動すればICSS報酬を獲得できる。RRPSTでは、ラットは、フィールド内をランダムに移動することによりICSS報酬を獲得できる。一方、PLTでは、フィールド内に二つの報酬領域を設定し、その間を往復することにより、それぞれの報酬領域に進入した時点でICSS報酬を獲得できる。以上のDMT, RRPSTおよびPLTを1日3試行ずつテストした。

結果および考察：レバー押しのためのICSS電流強度、およびDMTならびにRRPSTの学習日数では、4群(若齡ラット対照群, 老齡ラット対照群, 老齡ラット紅蔘末投与群, 老齡ラット非サボニン分画投与群)の間に有意差はなかった。一方、PLTでは、移動距離および報酬獲得数のいずれの指標においても、若齡ラット対照群と比較して老齡ラット群は有意に場所学習が障害された。しかし、老齡ラット対照群と比較して、老齡ラット紅蔘末投与群および老齡ラット非サボニン分画投与群では有意に場所学習が促進された。さらに、老齡ラット非サボニン分画投与群は、老齡ラット紅蔘末投与群よりも有意に場所学習が促進していた。以上より、老齡ラットの学習・記憶障害を改善する成分は紅蔘末の非サボニン分画に含まれていることが強く示唆される。

### 35. ヴァーチャルリアリティ呈示装置を用いた空間移動課題の開発

数井健一<sup>1,2,3</sup>, 堀悦郎<sup>1,2</sup>, 田淵英一<sup>1,2</sup>, 梅野克身<sup>1,2</sup>, 永福智志<sup>1,2</sup>, 佐々木和男<sup>3</sup>, 小野武年<sup>1,2</sup>, 西条寿夫<sup>1,2</sup> (1富山医科薬科大学・医学部・生理学, 2JST, CREST, 3富山大学・工学部・電気電子システム工学科)

海馬体は空間認知や空間学習に関与している。これまで海馬体と空間認知に関する研究は、げっ歯類でモリスの水迷路や8方迷路課題などを用いて数多く報告されている。

また、ヒトを用いた神経心理学的研究から、海馬体を活性化させるためには、個体が動き回れるような大規模空間を用いた課題が必要であることが示唆されている。本研究では、霊長類(ヒト, サル)の海馬体の機能を実験室内で明らかにする目的で、ヴァーチャルリアリティ(VR)を用いた広域空間移動課題の実験装置を開発した。本装置では、課題ソフトウェアにより、VR空間全体の大きさ、被験者の移動範囲を制限する壁の大きさ、空間手掛り刺激として用いるオブジェクト(岩, 木, 家, 旗, ポスターなど)の座標、および報酬を獲得できる領域(報酬領域)の位置と大きさを任意に設定可能である。作成したVR空間は、150×200cmのスクリーンに偏光フィルターを装備した液晶プロジェクターで投影し、被験者(サル)の両眼には、両眼視差による立体刺激を呈示するために偏光フィルター付きメガネを装着した。空間移動課題では、被験者にジョイスティックを操作させ、これらVR空間内を自由に移動して報酬領域に侵入することにより報酬を獲得する課題を学習させた。対照課題では、スクリーン上のポインターを移動させる課題を行なわせた。以上の空間課題における行動学的データの解析結果について報告する。

### 36. 社会的注意に及ぼす顔表情と視線方向の影響

堀悦郎<sup>1,2</sup>, 永福智志<sup>1,2</sup>, 蒲池みゆき<sup>3,4</sup>, 梅野克身<sup>1,2</sup>, 田淵英一<sup>1,2</sup>, 小野武年<sup>1,2</sup>, 西条寿夫<sup>1,2</sup> (1富山医科薬科大学・医学部・生理学, 2JST, CREST, 3ATR人間情報通信研究所, 4日本学術振興会)

相手が注意を向けている物(第三者)に自己の注意を向ける社会的注意は、コミュニケーションで重要な役割を果たしている。しかし、第三者を含めた社会的注意に関して、コミュニケーションで同様に重要な役割を果たしている顔表情や視線方向の影響は明らかにされていない。本研究では、社会的注意における相手の顔表情および視線方向の影響を検討した。実験には健康被験者8名(男性6名, 女性2名; 平均年齢, 21.1歳; 全員右利き)を用いた。課題は、開始音(ブザー)の後、ディスプレイ中央に注視点を呈示(1500msec)し、続いて様々な表情(真顔, 笑顔および怒り)と視線方向(左, 右および中央)を組み合わせた顔写真を呈示(100msec)した。その後、50msecの遅延期間を置いてディスプレイの左あるいは右にターゲット(+ )を呈示した。被験者には、ターゲットの位置を判断して左右に対応するキー(<あるいは>)を素早く押すように指示し、キー押しの反応時間を測定した。その結果、ターゲットが現れる直前に呈示した顔写真により、反応時間に差があることが明らかになった。すなわち、1)顔写真の視線方向とターゲットの位置が一致する場合は、一致しない

場合と比較して反応時間が早い, 2) この傾向は表情が「笑顔」である場合は他の表情と比較して有意に強いことなどが明らかになった。以上の結果から, 顔表情と視線方向が社会的注意におよぼす影響について考察する。

### 37. OPTICAL RECORDING IN THE CA1 REGION: EFFECTS OF ACETYLCHOLINE ITS AGONISTS AND ANTAGONISTS

Thucydides L. Salunga<sup>1</sup>, Takashi Kawashima<sup>1</sup>, Tadashi Akaike<sup>2</sup>, Tokio Sugai<sup>3</sup>, Norihiko Onoda<sup>3</sup>, Ken'ichi Matsunami<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Inst. of Equil. Res. Gifu Univ. Sch. of Med.; <sup>2</sup> Dept. of Oral Physiol., Hokkaido Univ. Sch. of Dentistry; <sup>3</sup> Dept. of Physiol., Kanazawa Med. Univ.)

Optical responses were recorded from the rat hippocampal slices, stained with RH 482, using a real-time optical recording system to study the cholinergic influence on hippocampal activity. A dual effect of ACh and CCh on the response to electrical stimulation was observed in the CA1 region and this was nearly abolished by atropine. Furthermore, GABA at low concentration attenuated the response and with the addition of ACh or CCh further inhibition was seen.

We conclude that the inhibitory effect of acetylcholine and its agonist can be brought by activating the muscarinic receptors in the GABAergic inhibitory interneurons, this activation increases the excitability of the interneurons and that synaptically released ACh increases interneuronal activity.

### 38. ラット大脳皮質視覚野におけるNMDA受容体依存性膜電位振動現象の光学的解析

吉村 弘<sup>1</sup>, 須貝外喜夫<sup>2</sup>, 加藤伸郎<sup>3</sup>, 小野田法彦<sup>2</sup> (金沢医科大学・口腔科学<sup>1</sup>, 第一生理<sup>2</sup>, 京都大学・大学院・医学研究科・認知行動脳科学<sup>3</sup>)

我々は今まで大脳皮質視覚野における膜電位振動発現機序を細胞内電位記録法を用いて調べてきた。その結果, カフェイン存在下で視覚野スライスの白質を低頻度反復刺激すると, 約10Hzの膜電位振動がII/III層で観察されることが判った。しかし, 振動がどこで発現して, どのように伝わるかについての詳細は不明であったので, 上述の膜電位振動の発現伝播様式を膜電位光学的計測装置を用いて二次元的に解析した。白質刺激直後, 深い層から浅い層に到達した興奮はその後表層を水平に伝播した。しかし, 最初の興奮のピーク潜時から約120ms後, 限局した浅い層に再び興奮が出現し, 興奮, 消退を数回繰り返した。このよ

うな振動性興奮は, 数個の島状の領域で引き起こされており, 深い層よりも浅い層で顕著であった。また, 刺激の部位を変えても, 同じ島状の領域で振動が引き起こされた。振動性興奮の発現後, 細胞外液にAP5を加えると, 刺激直後の興奮の伝播に変化はみられなかったが, それに続く振動性興奮はすべて可逆的にブロックされた。光学的計測と細胞内記録の結果を比較検討してみたところ, 今回観察された振動性興奮は細胞内記録での膜電位振動を反映していることがわかった。以上のことから, 大脳皮質視覚野には膜電位振動を起こしやすい領域が浅い層に限局して存在すること, さらに単発刺激による最初の興奮はNMDA受容体に依存しないが, それ以後の膜電位振動はNMDA受容体に依存して引き起こされることが示唆された。

### 39. Neuronal responses of posterior cingulate cortex in sensory stimuli and reward association tasks

Akemi A. Furusawa, Eiichi Tabuchi, Etsuro Hori, Katsumi Umeno, Taketoshi Ono, Hisao Nishijo (Dept. Physiol., Fac. of Med., Toyama Med. & Pharmaceu. Univ. & JST, CREST)

Rat posterior cingulate neurons were recorded during performance of a sensory-reward (or non-reward) association task. After implantation of bipolar electrodes for the intracranial self-stimulation (ICSS), the rats were trained to lick a spout protruded near their mouths after 2-sec presentation of sensory stimuli and 1-sec delay to obtain rewards (ICSS or 0.3 M sucrose solution) in a restraining cage. Ten kinds of sensory stimuli (tone, light, or combination of tone and light) were associated with rewards or non-reward. Of a total of 600 neurons recorded, 450 (75%) responded in one or more phases of the task. Most responsive neurons responded during the reward period (399/450, 89%). Only a few neurons significantly responded during presentation of sensory stimuli and/or delay period, and few responded tonically during 2-s presentation of sensory stimuli. Most neurons that responded during the reward period differentially responded during licking for ICSS and for sucrose solution. Furthermore, some of these neuronal activities were correlated to individual licking. However, no correlation to any mouth movements was observed during the inter-trial interval. On the other hand, local field potential in the posterior cingulate cortex revealed theta wave also synchronized with licking behavior. The results suggest that the posterior cingulate cortex is involved in execution of learned

behaviors, and in monitoring and evaluation of efferent copies of motor commands.

#### 40. 金魚視神経切断後のトランスグルタミナーゼ活性の変動

杉谷加代<sup>1,2</sup>, 菅原 清<sup>2</sup>, 加藤 聖<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>金沢大学医学部保健学科, <sup>2</sup>金沢大・院・医・分子神経情報 )

ヒトをはじめとする哺乳動物の中樞神経組織は、一旦損傷を受けると再生しないとされているが、魚類や両生類などでは、視神経を切断しても完全な修復、再生がみられることがわかっており、金魚の視神経では、切断後約30日で再生する。今回、神経再生に関与するといわれるトランスグルタミナーゼ (TG) に着目し、金魚の視神経再生過程におけるTGの役割を研究する目的で酵素活性の変化を経時的に測定した。サンプルは、視神経切断後、一定時

間の経過した網膜および視神経の到達点である視蓋を採取し、組織をホモジェネートし、その遠心上清を用いた。TG活性測定は、<sup>14</sup>C-ブトレッシンのカゼインへの取り込みにより算出した。

その結果、網膜および視蓋とも切断後TG活性は経時的に上昇し、2週後には、網膜で切断前の約7倍とピークを示し、視蓋でも約2倍の活性値を示した。その後、この活性上昇は、6週目まで維持され、8週後になってコントロールのレベルまで戻ることがわかった。一方、TGのmRNA発現量のピーク値も切断前の5~7倍と同様な時間経過を示し、その値はタンパクレベルでの変動と同調することが確認された。したがって、視神経の再生過程の初期および視神経の末端が視蓋に到達し、シナプスを形成する時期に一致してTG活性の上昇、終息が観察されることから、TGが重要な役割を果たしていることが示唆された。