

第95回近畿生理学談話会

日 時：平成14年8月24日（土曜日）
 会 場：和歌山県立医科大学 生涯研修・地域医療センター研修室
 当番幹事：和歌山県立医科大学生理学教室 玉井靖彦 前田正信
 演 題 数：一般演題25題，特別講演1題
 参 加 者：61名
 評議員会会場：和歌山県立医科大学 生涯研修・地域医療センター会議室
 評議員会出席者：29名

平成10年に統合移転された和歌山県立医科大学の生涯研修・地域医療センターにて，61名の会員の参加を得て，第95回近畿生理学談話会が開催された。口頭による一般演題25題の熱心な発表と活発な討論が行われた。自分の専門とする分野以外の発表に耳を傾けられる地方会の意義があらためて認識させられた。また，今回は大阪大学大学院情報薬理学の倉智嘉久教授に「2009年IUPS日本開催と生理学会の取り組み」との題で特別講演をしていただいた。会員にとって，2009年のIUPSが身近に感じられるようになった。評議員会では，常任幹事により常任幹事会報告があった。生理学会年次大会発表の英語化についての報告では，評議員会は例年になく白熱した議論となった。地方会の評議員会は，一般評議員が常任幹事に直接意見を言うことができる良い機会であると再認識させられた。なお，今回は京都府立医科大学生理学教室が当番となり開催されることになった。

1. TNFおよびIL-1刺激血管内皮細胞によるヒト好中球の活性化

羽藤文彦，鈴木賢一，高橋達治，北川誠一（大阪市立大学・院・医・細胞情報学）

炎症性サイトカインにより刺激された血管内皮細胞が好中球機能に及ぼす影響ならびにその機序について，ヒト臍帯静脈より分離した血管内皮細胞（HUVEC）と健康人末梢血好中球を用いて *in vitro* 共培養系で好中球の活性化をスーパーオキシド（ O_2^- ）産生を指標として検討した。TNFやIL-1で刺激したHUVECと好中球を共培養することにより O_2^- 産生・放出ならびに接着が亢進した。この O_2^- 産生亢進作用はTNF及びIL-1刺激HUVECの培養上清中に認められ，GM-CSFの中和抗体及び血小板活性化因子（PAF）receptor antagonistにより有意に抑制された。TNFやIL-1刺激によりHUVECからのGM-CSFの産生が誘導されるが，このGM-CSF産生はMEKやp38 MAPKの阻害剤で抑制されなかった。TNF，IL-1刺激によりHUVECから分泌されるGM-CSFに相当するGM-CSFで好中球を刺激すると O_2^- 産生・放出が亢進し，PAF添加によりその作用は増強された。以上より，TNF，IL-1刺激により血管内皮細胞はERKやp38 MAPK以外の細胞内情報伝達系を介しGM-CSF，PAFの産生亢進が誘導され，

これらの協調作用により好中球が活性化されることが判明した。

2. マウスにおける炎症性反応と線溶系因子の変動

岡田清孝，上嶋 繁，松尾 理（近畿大学・医学部・第二生理）

〔目的〕マウスに細菌性毒素（LPS）を投与した時，線溶活性の低下と凝固活性の亢進が認められ，各臓器でフィブリン沈着が生じる。また，LPSにより炎症性細胞の誘導が見られる。そこで，マウスに対するLPS刺激による凝固・線溶系と血球成分の変動との関係について検討した。〔方法〕マウス腹腔内にLPS（50 μ g）を投与し，経時的に採血した。血球分布は多項目自動血球分析装置動物解析ユニットSFVU-1（シスメックス（株））とライト・ギムザ染色による塗末標本で計測した。血漿中の線溶活性はフィブリンザイモグラフィーとリパースフィブリンザイモグラフィーで検討した。肝臓および腎臓における線溶系因子の発現はノーザンブロット法で検討した。〔結果〕LPS投与3～6時間後に白血球数は低下し，その後増加回復した。白血球分布では8時間以降に好中球の割合の増加が認められた。また，血小板数は3時間～3日後まで低下傾向を示した。血漿中の線溶系因子では3～8時間後にPAI-1活性

の増加とPA活性の低下が見られた。肝臓および腎臓組織でのPAI-1mRNA発現は3～8時間に有意に増加した。[考察] LPSは線溶活性の低下や血小板の局所組織周囲への動員から各組織での血栓形成傾向を生じ、炎症性細胞も誘導されると考えられる。

3. ラット脳室周囲器官（脳弓下器官・下垂体後葉）毛細血管の水透過性の測定

瀬尾芳輝¹、鷹股 亮²、荻野孝史³、森田啓之⁴、村上政隆⁵（¹京都府立医科大学・第一生理、²奈良女子大学・生活環境学部・生活健康、³精神神経センター・神経研、⁴岐阜大学・医学部・第一生理、⁵生理研・分子生理）

ラット脳弓下器官毛細血管の水透過性を求めた。Gd-DTPAを静注し、脳室周囲器官および脳実質各部位のT1緩和速度を測定した。投与量を漸次増加していくと、脳血管関門（BBB）の堅固な皮質や視床では $1/T_1$ （0.7/s）は変化しなかったが、脳弓下器官（SFO）では1.5/sに増加し、1.5mmol/kg以上では一定値を示した。下垂体後葉やBBBの存在しない皮膚では、Gd-DTPA投与量に比例して $1/T_1$ が増加した（ $>10/s$ ）。また、BBBを高張輸液により破壊した場合、脳実質やSFOでは $1/T_1$ の増加が認められたが、下垂体後葉や皮膚では変化しなかった。以上の結果より、正常なSFO毛細血管はGd-DTPAを透過せず、Gd-DTPA投与による $1/T_1$ の変化量（0.84/s）は、毛細血管を介しての水の交換速度を反映していると考えられる。毛細血管体積表面積比より、拡散透過係数は $3.7 \times 10^{-3} \text{cm/s}$ となった。この値は、腎直血管や筋毛細血管と同程度の値であり、BBBより10から100倍大きいことが明らかとなった。

4. ラット脳表における酸素分圧分布の可視化

伊藤俊之¹、木村聡志²、松本圭吾³（¹京都府立医科大学・第一生理、²脳神経外科、³社会保険神戸中央病院・脳神経外科）

脳梗塞の治療に際して虚血再灌流障害が大きな問題となっているが、その病態はまだ十分解明されていない。虚血再灌流時に脳の酸素分圧は重要な代謝の指標であるが、通常の酸素電極法では電極を刺入するため皮質が傷害される。また一点測定であるため、脳表における酸素分圧の二次元分布が計測できない等の限界があった。そこで我々は、先に開発した酸素感受性蛍光薄膜センサーを応用して脳表の酸素分圧のmappingを試み、その有用性と問題点を検討した。検討にあたっては、ラット前脳虚血モデル（4血管閉塞モデル）を用いた。これは前もってラットの両側椎骨動脈を外科的に閉塞しておき、実験当日には両側総頸動

脈を阻血/解除することで前脳虚血/再灌流を与える方法で、Pulsinelliらの方法に準じて作成した。酸素分圧をmappingする原理は、酸素感受性蛍光色素を薄膜状に固定してプローブ膜とし、これをラット頭蓋骨に設けたcranial windowを介して脳表に密着させて、落射蛍光顕微鏡的に観測するものである。蛍光色素として、酸素存在下で蛍光が減弱する（oxygen quenching）する性質を持つtris（1,10-phenanthroline）ruthenium chloride hydrateを用いた。4血管閉塞モデルで得られた酸素分圧分布の変動につき、ドップラー血流計や針型酸素電極による計測結果と併せて報告する。

5. イソプロテレノール誘導肥大心の心力学的エネルギー学的評価

北川 豊、山下大輔、伊藤治男、坂田 進、竹中千香子、高木 都（奈良県立医科大学・第二生理）

【目的】イソプロテレノール（ISO）慢性投与により誘導したラット肥大心の左心室（LV）機能の解析を生体位心で行うことを目的とした。【方法】ISO（2.4mg/kg/day）またはvehicle（saline 2.4ml/kg）を3日間ラットに皮下投与した。麻酔後人工呼吸下に開胸し、コンダクタンスカテーテルと圧センサー付きカテーテルを左心室尖より挿入し、左室圧容積ループを連続測定した。大動脈基部を閉塞して後負荷を増大させ、左室収縮期末圧容積関係（ESPVR）を得た。左室の絶対容積を得るために肺動脈より10%の高張食塩水を微量注入した。【結果】心臓の湿重量と乾燥重量の測定によってISO投与群の心肥大を確認した。ESPVRの可動範囲のほぼ中程度の左室容積（mLVV）と1回心拍量（SV）は有意に減少した。また、ESPVRから得られたmLVVにおける圧容積面積（pressure-volume area：PVA_{mLVV}）は有意に減少した。実効動脈エラストランス（Ea）は増加した。HRに変化はなかった。【結論】mLVVにおける一心拍当たりの総機械エネルギーを表すPVA_{mLVV}を評価することで、ISO誘導肥大心における左室機能の低下が明らかとなった。

6. 動脈圧反射の動特性はアンジオテンシンIIの静脈投与で変化しない

川田 徹、柏原考爾、柳谷雄介、杉町 勝、砂川賢二（国立循環器病センター研究所・循環動態機能部）

【目的】アンジオテンシンII（AngII）は種々の循環器疾患において動脈圧反射を修飾するとされているが、開ループ条件下でAngIIが動脈圧反射に及ぼす影響を調べた研究はない。本研究ではAngIIの病態生理学的な役割を解明するために、AngIIの静脈内投与が動脈圧反射の動特

性に及ぼす影響を調べた。【方法】麻酔下家兎7羽において、迷走神経及び大動脈神経を除神経した。体循環から分離した頸動脈洞に振幅20mmHgの2値白色雑音を10分間入力し、腎臓交感神経活動(RSNA)及び体血圧(AP)の応答を記録した。動脈圧反射の中樞弓の特性を示す圧入力からRSNAまでの伝達関数と、末梢弓の特性を示すRSNAからAPまでの伝達関数を推定した。次に、AngIIの静脈内持続投与(100ng/kg/min)を開始し、30分後から10分間のデータを用いて中樞弓と末梢弓の伝達関数を推定した。【結果】AngII投与で平均APは有意に上昇したが、平均RSNAは変化しなかった。AngIIは中樞弓及び末梢弓の伝達関数を変化させなかった。【結論】平均圧入力を一定に保った条件下では、AngIIの静脈投与は動脈圧反射の動特性を変化させない。

7. 脊髄電気刺激を用いたバイオニック圧反射システムの作成

柳谷雄介, 川田 徹, 柏原考爾, 砂川賢二(国立循環器病センター研究所・循環動態機能部)

バイオニック圧反射システム(Bionic Baroreflex System; BBS)は、Shy-Drager症候群のような中枢制圧反射失調を克服する機能代行システムである。本研究は、脊髄電気刺激を用いたBBSにより起立性低血圧を防ぐことができるかどうか検証した。【方法】麻酔下ネコの圧受容器神経を切断して圧反射失調モデルとした。T12-L1硬膜外に脊髄刺激用電極を挿入した。60度のhead-up tilt(HUT)により動脈圧に外乱を与え、BBSを評価した。人工的血管運動中枢のアルゴリズムは、設定値と動脈圧の差分比例項のみ(P)、差分比例項+動脈圧の時間微分比例項(P+D)とした。【結果】BBS非駆動時には、HUTにより動脈圧が 68.0 ± 5.3 mmHg低下した。開ループゲイン3に設定すると、動脈圧低下は $P 16.0 \pm 5.3$, $P + D$; 18.80 ± 7.2 mmHgと抑制された。また、定常応答に達する時間は、Pと比べてP+Dの方が速かった。【結論】①脊髄電気刺激を用いたBBSにより、HUTによる低血圧を防ぐことができた。②適切な微分特性を持った人工的血管運動中枢を設計することにより、迅速に動脈圧を安定させることができた。

8. 小脳失調マウスの病態解明と移植治療の試み

久宝真一¹, 玄番史恵¹, 比舎弘子², 足立 靖³, 池原進²(¹関西医科大学・第二生理, ²第一病理, ³病理解剖)

pcd(Purkinje cell degeneration)マウスは生後3週で正常な小脳の神経回路がほぼ出来上がるが、その後プルキンエ細胞(P cell)が変性脱落して、運動失調(形質発現)

を呈するミュータントマウスである。原因遺伝子(Nnal)が最近同定されたが、P cellの細胞死との関係は解明されていない。生後4~5週の幼弱マウスのP cellを抗カルビンディン抗体で染めると、残存P cellの形態異常とその細胞内の異常封入体(抗ユビキチン抗体強染性)が観察された。現在、P cellの細胞死の原因を研究中である。一方、pcdマウスは常染色体劣性遺伝形式をとるので、従来の移植研究では形質発現後に移植していたが、その移植時点で、既にほとんどのP cellは脱落して、十分な運動失調改善効果は殆ど認められなかった。最近、pcdマウスの発症個体を単純配列長多型を利用した遺伝子診断によって、形質発現以前に判別できる。そこで形質発現前(P cellの脱落以前)でしかも小脳皮質の神経結合が未熟な時期(生後1週前後)に移植したところ、一部の移植マウスで移植細胞の生着が確認でき、ごく軽微な症状改善効果が認められた。

9. 電気刺激による軸索損傷網膜神経節細胞の生存促進効果発現の条件

岡崎祐香, 森本 壮, 澤井 元, 福田 淳(大阪大学大学院・医学研究科・情報生理学講座)

視神経切断後の網膜神経節細胞の逆行性変性死を阻止することは視神経再生の前提条件である。我々は、成熟ラットの視神経を切断した直後にその眼球側切断端へ電気刺激を加えると、切断1週間後の網膜神経節細胞の生存率が54%から83%にまで上昇することを見出した(Morimoto, et al. '02)。今回、この電気刺激の有効条件を検討した。その結果、①有効刺激強度は網膜神経節細胞の逆行性活動電位を発生させるのに十分なこと、②電気刺激は視神経切断直後に少なくとも30分以上与えれば有効であること、③視神経切断前あるいは切断から3~24時間の遅延時間を置いた後に加えた電気刺激では、生存促進効果が低下することがわかった。さらに、切断直後に加えた電気刺激の生存促進効果は切断後2および4週間でも認められた。以上の結果は、電気刺激が網膜神経節細胞を逆行性に興奮させることによって軸索損傷後における逆行性変性の開始を阻害している可能性を示唆している。

10. 顔面神経縫合後のネコ三叉神経—顔面神経反射の可塑的变化

松浦 徹, 浅原俊弘, 山本哲朗(三重大学・医学部・第二生理)

顔面神経縫合後の三叉神経—顔面神経反射の変化を調べる目的で縫合後の瞬目反射と縫合側の三叉神経—顔面神経反射放電パターン様式及び縫合側の三叉神経求心性線維終末の分布について正常ネコと比較検討した。正常ネコでは

眼瞼周囲の触刺激によって瞬目反射は同側にのみ出現するが、顔面神経の側頭-頬骨-眼窩筋筋枝神経と上、下頬唇筋筋枝神経を一括した分枝 (MB) を切断縫合後、早期 (7~14日目) には瞬目反射は両側性に出現し、ほぼ同時に縫合側の耳介の動きも観察された。そこで顔面神経縫合後の神経再生過程において三叉神経眼窩下神経を刺激し、顔面神経のMBや縫合に関係していない後耳介筋を支配する後耳介筋筋枝神経 (PA) から反射放電を記録した。同様の実験を軸索切断放置ネコについても行った。正常及び軸索切断放置ネコでは反射放電はMBからのみ記録されたが、縫合後早期のネコではMBのみならずPAからも記録された。これらの変化は縫合後2~5週間で正常や軸索切断ネコで見られる放電パターンに戻る事がわかった。また縫合早期に三叉神経求心性線維終末の分布を調べたところ、正常ネコに比べ、三叉神経主知覚核と三叉神経脊髄路核内の吻側亜核及び尾側亜核で終末数が増加し、中間亜核では減少していた。

11. シナプス前カイニン酸受容体を介する海馬苔状線維の後脱分極応答

神谷温之¹、真鍋俊也^{1,2} (¹神戸大・院・医・細胞神経生理, ²東大医科研・基礎医学・神経ネットワーク)

海馬CA3野苔状線維シナプスは極めて大きな二発刺激促進を示す特徴がある。我々はこれまでに、カイニン酸受容体の活性化を介してシナプス前終末へのカルシウム流入が活動依存的に充進するという新たな機構を見出した。今回、この機構について追及するために、苔状線維シナプス前部での光学的膜電位測定を行った。マウス海馬スライス標本において入力線維層 (CA3野透明層) に蛍光膜電位感受性色素を注入して拡散により苔状線維のみを標識し、蛍光強度変化を指標にシナプス前部での膜電位変化を計測した。単発電気刺激に応じて、活動電位を反映すると考えられる一過性の速い成分と、300ミリ秒ほど持続する後脱分極成分の二相性の脱分極応答が記録された。テトロドトキシンはその両者を遮断した。AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体阻害剤CNQXは前者には影響を与えず後者のみを選択的に抑制した。活動電位により苔状線維終末から放出されたグルタミン酸がシナプス前カイニン酸受容体に作用して後脱分極応答を生じると考えられた。シナプス前カイニン酸受容体を介した後脱分極が電位依存性カルシウムチャンネルの状態変化を引き起こし、二発刺激によるカルシウム流入の促進を引き起こすと推定した。

12. 運動強度の違いおよびトレーニングの有無が運動誘発性酸化ストレスに与える影響

青井 渉¹、坂元直之²、一石英一郎²、内藤裕二²、吉田憲正²、丸中良典¹、吉川敏一² (¹京都府立医科大学第一生理解学教室, ²同第一内科学教室)

【目的】運動は日常化することで健康維持増進に寄与するが、一方で活性酸素種生成を充進させる。しかし、生体が受ける運動ストレスは種々の条件によって左右され、生じる酸化ストレスも一様ではないと思われる。本研究では運動強度の違いやトレーニングの有無によって運動による骨格筋酸化傷害の程度が異なるか検討した。また、トレーニングにより組織中の抗酸化酵素含量が変動するかについても検討した。【方法】SD系雄ラットを安静群とトレーニング群に分けて4週間飼育した。トレーニング群には比較的強度の高いトレッドミル走運動を週5回負荷した。最終日に、中等度あるいは高強度の急性運動をそれぞれ負荷した。腓腹筋における過酸化脂質の生成を測定した。また、腓腹筋、心筋、肝臓および腎臓における抗酸化酵素蛋白含量を定量した。【結果】急性運動による腓腹筋の過酸化脂質生成は安静群と比較して高強度において有意に増大したが、中等度強度やトレーニング群では変動しなかった。トレーニングによる抗酸化酵素の増量は骨格筋のほか心筋、肝臓および腎臓において認められた。【考察】本研究により、生体が受ける運動誘発性酸化ストレスは運動強度や身体特性によって左右されると考えられる。トレーニングによる骨格筋の酸化傷害抑制は抗酸化酵素が増量したことによると推察される。また、酵素の増量は骨格筋だけでなく内臓組織においてもみられたことから、トレーニングによる抗酸化能の向上は全身におよぶ可能性がある。

13. ラット後肢筋の発育における抗重力筋活動の役割

大平充宣¹、河野史倫¹、竹野欽昭¹、中野直子¹、王 曉東¹、石原昭彦² (¹大阪大学・健康体育部, ²京都大学・総合人間学部)

抗重力筋活動がラットにおける各種後肢筋の発育に及ぼす影響を検討した。生後4日齢のウイスター系ラットを任意に、コントロール群、後肢懸垂群、2G負荷群に分けた。それぞれの実験群には生後4日目から3カ月目までの後肢懸垂、又は動物用遠心機を用いた2G負荷を課し、更その後3カ月間のケージ内飼育を実施した。その結果、コントロール及び2G負荷群では、生後3カ月の発育に伴う絶対筋重量及び体重比相対重量の増加が全筋で進行した。2G負荷群とコントロール群間には大差は認められなかった。しかし、後肢懸垂群のヒラメ筋及び長内転筋には、発育に伴う体重比の相対筋重量の増大は全く起こらなかった。足底筋、内側腓腹筋及び外側腓腹筋の体重比相対重量は増大したものの、有意な発育抑制が認められた。これら

は、懸垂終了後回復したが、3カ月後でも同年齢のコントロール群値には至らなかった。前脛骨筋及び長指伸筋の発育は後肢懸垂の影響を受けなかった。メスよりもオスの絶対筋重量が大であったが、体重比の相対重量には性差は認められなかった。以上の結果、ラット後肢筋の発育に及ぼす抗重力活動の影響は筋特異的であり、特に足関節伸筋群及び長内転筋の発育における重力負荷の重要性が示唆された。

14. ラット長内転筋筋線維の発育・分化における抗重力筋活動の役割

竹野欽昭, 河野史倫, 中野直子, 王 曉東, 大平充宣 (大阪大学・健康体育部)

生後3カ月間の2G負荷, または後肢懸垂がラット長内転筋の筋線維数, 及び筋線維タイプの分化に及ぼす影響を検討した。生後3カ月目に長内転筋を摘出し, 全筋の凍結横断切片 (10 μ m 厚) を作成した。それらに type I 又は type II myosin heavy chain specific な抗体を用いた染色を施し, 筋線維平均横断面積 (CSA), 全筋線維数, 及び筋線維タイプ分布を調べた。その結果, 全筋 CSA はコントロール群, 2G 群, 懸垂群でそれぞれ $2,106 \pm 41$, $2,155 \pm 75$, $1,040 \pm 159 \mu\text{m}^2$ (means \pm SE) であった。2G 負荷による影響は認められなかったものの, 懸垂群ではコントロール群の半分ほどであった ($P < 0.05$)。全筋線維数はコントロール群 $2,014 \pm 105$, 2G 群 $2,152 \pm 106$, 懸垂群 $2,076 \pm 71$ 本で差はなかった。筋線維タイプ分布にも 2G 負荷の影響は認められなかったが, 懸垂群では type I MHC のみを発現する筋線維がコントロール群に比べ約 24% 少なく, type II のみを発現する筋線維が約 20% 多かった ($p < 0.05$)。以上の結果から, 抗重力筋活動抑制に伴うラット長内転筋の発育抑制は筋線維数の増加抑制によるものではないこと, さらに, 筋線維サイズの増大及び遅筋線維化には重力負荷が必須であることが示唆された。

15. 発育期の抗重力活動抑制がラットヒラメ筋の発育に及ぼす影響

王 曉東, 河野史倫, 竹野欽昭, 中野直子, 大平充宣 (大阪大学・健康体育部)

生後3カ月間の後肢懸垂がラットヒラメ筋筋線維の発育に及ぼす影響を検討した。生後3カ月目にコントロール及び懸垂群よりヒラメ筋の摘出を行った。湿重量測定後, 筋をほぼ生体内長にストレッチし, 液体窒素で冷やしたイソペンタン中で瞬間凍結した。さらに, OCT コンパウンドでコルクに立てた後, -20°C のコールドトーム内で連続横断切片 (10 μ m 厚) を作成した。これらの切片に,

type I 又は type II myosin heavy chain (MHC) specific な抗体を用いた染色を施し, 全筋の横断面積 (CSA), 筋線維タイプ分布および全筋線維数を調べた。その結果, 懸垂群及びコントロール群のヒラメ筋 CSA はそれぞれ $2,197,800 \mu\text{m}^2$, $11,394,000 \mu\text{m}^2$ であった ($p < 0.05$)。また, 懸垂群において type I MHC のみを発現する筋線維は, コントロール群よりも約 22.7% ($p < 0.05$) 少なかった。逆に, コントロール群に比べ type II MHC fibers は 14% ($p = 0.056$), 両 type の MHC を発現する筋線維は 8.7% ($p = 0.099$) 懸垂群が多かった。また, ヒラメ筋の全筋線維数は約 2,500 本で, 懸垂群とコントロール群に差は認められなかった。以上の結果から, 筋サイズ及び筋線維タイプの発育に伴う発達は重力負荷と密接に関わっているが, 筋線維数の調節は遺伝的にプログラムされているものと示唆された。

16. ラットヒラメ筋筋線維の発育・分化における抗重力筋活動の役割

河野史倫, 竹野欽昭, 中野直子, 王 曉東, 大平充宣 (大阪大学・健康体育部)

生後3カ月間の後肢懸垂がラットのヒラメ筋筋線維の発育に及ぼす影響を検討した。生後3カ月目に懸垂及びコントロール群よりヒラメ筋を摘出し, 全単一筋線維を取り出した。筋線維長やサルコメア数は後肢懸垂によっては変化しなかったものの, 懸垂群の筋線維横断面積は, コントロール群の約 1/5 であった。懸垂群における全単一筋線維当たりの筋核数や筋核 1 個当たりの筋細胞質支配領域はコントロール群に比べそれぞれ 59% 及び 29% 低値であった。しかし, 懸垂群の筋核容積はコントロール群に比べ 35% 大きかった。筋核容積 $1 \mu\text{m}^3$ 当たりの DNA 含量はコントロール群に比べ 20% 少なかったが, 筋核 1 個当たりではコントロール群と差がなかった。懸垂群における休止期及び分裂期の衛星細胞数は, それぞれコントロール群に比べ 78% 及び 73% 少なかった。また, コントロール群では約 97% の筋線維が 1 つの神経・筋接合部を保有していたのに対し, 懸垂群では約 60% で, その他約 32%, 7%, 1% の筋線維はそれぞれ 2 つ, 3 つ, 5 つの神経・筋接合部の全単一筋線維中に保有していた。以上の結果から, 生後起こるヒラメ筋筋線維の発育や分化は重力負荷と密接に関わっていることが示唆された。

17. アンブロキシソールが遠位尿管培養細胞の Cl⁻ イオン輸送に及ぼす効果の検討

土谷 庸, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学・第一生理)

アンブロキソールは去痰剤として知られているが、その詳細な作用機序については不明である。我々は、アンブロキソールの作用機序として、上皮細胞のイオン輸送を制御する可能性を考え、アンブロキソールが遠位尿細管由来培養上皮細胞（A6細胞）の起電性Clイオン輸送に及ぼす効果を検討した。Ussingチャンバーを用いて、NPPB感受性短絡電流およびコンダクタンス変化を指標として、起電性Clイオン輸送変化を評価した。本研究は、フォルスコリンで起電性Clイオンを増大させた条件下で行った。アンブロキソールは、30 μ Mより高濃度でNPPB感受性短絡電流を抑制した。さらに、アンブロキソールはNPPB感受性コンダクタンスも抑制したが、その効果は200 μ M以上の濃度でのみ観察された。以上の結果より、アンブロキソールは、低濃度下においてはClの細胞内への取り込み過程を抑制し、高濃度下においてはNPPB感受性Clチャンネルを介するClの細胞外への流出過程を抑制することにより、起電性Clイオン輸送を抑制することが明らかになった。

18. Activation of Stress Activated Protein Kinases by Cell Swelling in Renal Epithelial A6 cells

Naomi Niisato and Yoshinori Marunaka (Dept. of Cell. Mol. Physiol., Kyoto Pref. Univ. of Med.)

Osmotic shock is well recognized as one of the factors activating stress activated protein kinases (SAPKs), p38 MAP kinase and c-Jun N-terminal kinases (JNKs). In renal epithelial A6 cells, hypo-osmotic shock transiently activated SAPKs with maximal activation at 5 min. A6 cells showed a regulatory volume decrease (RVD) following initial cell swelling when the cells were exposed to a hypo-osmotic solution. In contrast, activation of SAPKs was maintained over 90 min after hypo-osmotic shock was applied in the presence of 5-nitro-2-(3 phenylpropylamino) benzoic acid (NPPB, a Cl⁻ channel blocker), which completely blocked the RVD and kept the cell continuously swelling. Exposure of the cell to a high K⁺ iso-osmotic solution containing nystatin, which induces continuous cell swelling, also caused continuous activation of SAPKs. Furthermore, membrane deformation induced by chlorpromazine activated SAPKs. These results suggest that the change in membrane tension by cell swelling or chlorpromazine, but not osmolality, is an important step for activation of SAPKs in A6 cells. Supported by Japan Society for the Promotion of Science (13670046) and the Salt Science Research Foundation (0143).

19. Action of Ca²⁺ channel blockers on Na⁺ transport in fetal rat alveolar type II epithelium

Yoshinori Marunaka and Naomi Niisato (Dept. of Cell. Mol. Physiol., Kyoto Pref. Univ. of Med.)

A β -agonist stimulated amiloride-sensitive Na⁺ absorption in fetal rat alveolar type II (FATII) epithelium, contributing to the clearance of lung fluid. Cytosolic Ca²⁺ plays an important role in β -agonist-stimulated Na⁺ absorption. Therefore, we studied whether Ca²⁺ channel blockers (Ni²⁺, verapamil, and nifedipine) affect β -agonist-stimulated Na⁺ absorption. Ni²⁺ partially blocked a nonselective cation (NSC) channel responsible for the β -agonist-stimulated Na⁺ absorption as the Na⁺ entry pathway across the apical membrane, but did not diminish the β -agonist-stimulated Na⁺ absorption. We determined whether the rate-limiting step of the β -agonist-stimulated Na⁺ absorption is the extrusion step across the basolateral membrane by the Na⁺, K⁺-pump. The other Ca²⁺ channel blockers, verapamil and nifedipine, had effects identical to those of Ni²⁺. We conclude that, in the β -agonist-stimulated FATII epithelium, Ca²⁺ channel blockers diminish activity of NSC channels, but do not affect transcellular Na⁺ absorption, since under the β -agonist-stimulated condition the Na⁺, K⁺-pump is the rate-limiting step in Na⁺ transport. Supported by the Salt Science Research Foundation (0143) and Japan Society for the Promotion of Science (13670046).

20. モルモット洞房結節におけるHCN4遺伝子のクローニングとその機能解析

丁 維光¹, 磯野高敬², 豊田 太¹, 安田 洋¹, 尾松万里子¹, 松浦 博¹ (¹滋賀医科大学・第二生理, ²実験実習機器センター)

過分極誘発性内向き電流 (Hyperpolarization-activated inward current, I_hもしくはI_i)の活性化は、心臓洞房結節細胞にみられる拡張期緩徐脱分極相(ペースメーカー電位)の発生に寄与していると考えられている。また、I_hの発現はHCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel) 遺伝子によりコードされていることが報告されている。我々はモルモット洞房結節からRT-PCR法を用いてHCN遺伝子のクローニングを行い、得られたHCN4遺伝子を培養細胞(COS7細胞)に導入して、その機能解析を全細胞型パッチクランプ法を用いて行った。過分極ステップパルスを与えるとき時間依存性の内向き電流が活性化され、その活性化の程度は膜電位依存性であ

った(半最大活性化電位 ≈ -75 mV). また, この内向き電流はCsCl (5mM) によって抑制された. さらに細胞内にcAMP (300 μ M) を負荷するとHCN4電流の活性化の膜電位依存性は脱分極方向へ有意に偏位した(半最大活性化電位 ≈ -55 mV). これらのHCN4電流の特性は単離モルモット洞房結節細胞から記録された I_h の性質と類似していた.

21. 心筋の収縮階段現象から求めたCaバッファー能

倉富 忍, 松岡 達, 皿井伸明, 野間昭典(京都大学・大学院・医学研究科・生体制御医学講座・細胞機能制御学)

心筋細胞のCaバッファーは, 様々な分子種で構成されており, 全体として解離定数(Kd)が $0.5 \sim 1.0 \mu$ M, 最大結合容量(Bmax)が $100 \sim 200 \mu$ Mでよく表されている(Eisner et al. 2000). 一方, 生理学的なSRからのCa放出は, ピーク値で 4.2 mM/s (Song et al. 1998), $3 \sim 5 \text{ mM/s}$ (Sipido & Wier 1991)であり, 持続時間を約 $10 \sim 20 \text{ ms}$ とすると, $100 \sim 200 \mu \text{ M/twitch}$ と考えられる. すなわち, 生理的状態でもCaはCaバッファーへの結合と解離を繰り返していると考えられ, Caバッファーの正確な測定が重要である. 今回の研究では, モルモット単離心筋細胞を使用し, 電位固定実験を行い膜電流と平均筋節長を同時記録した. SRとCa電流を阻害し, Na/Ca交換逆モード電流で惹起される持続性収縮を記録した. この実験条件下で, 連続脱分極パルスを与え, 筋節長短縮の陽性階段現象を記録した. 更に, 膜Na/Ca交換電流をNi感受性電流として測定し, それから求めるパルス毎の総Ca収支を求めた. 一方, 筋節長変化の細胞内遊離Ca濃度依存性(Sasaki et al. 1999)をもとに, 細胞内Ca濃度を求めることによって, $B_{\text{max}} = 200 \mu \text{ M}$, $K_d = 620 \text{ nM}$ というCaバッファー能を求めることができた.

22. オブジェクト指向を用いた心筋細胞モデルの拡張

皿井伸明, 倉富 忍, 松岡 達, 野間昭典(京都大学・大学院・医学研究科・生体制御医学講座・細胞機能制御学)

これまで我々は心筋細胞における興奮収縮連関の機序を明らかにする目的で, 活動電位, 細胞内 Ca^{2+} シグナルと細胞収縮を含む京都モデルを作成してきた. これを更に自活心筋細胞モデルへと拡張していく為に, プログラミング手法としてオブジェクト指向を用いた. 細胞を構成する要素はある物質の局在, 立体構造変化及び相互反応に還元できることから, 全構成要素を基質, 区画, 状態遷移, 相互反応に分解した. そして, 分解した個々のチャンネル, 酵素

などの機能単位をモジュール化して記述することができた. 個々のモジュールは完全に独立しており, 他の構成要素と無関係に交換, 改変をすることができる. この手法は新たな知見の組み込みや, モジュールの組み合わせによって心筋以外の細胞モデルを表現するための基礎となりうる. この手法を用い, 新たにATP代謝系を京都モデルに組み込んだ. エネルギー代謝においては, Na^+/K^+ ポンプ, Ca^{2+} ポンプ, 収縮蛋白におけるATP消費系について, 現在のモデルを用い, 見積もることができる. ATP感受性を既存のモジュールに組み込み, 解糖系, ミトコンドリアによるATP産生, クレアチンキナーゼ, アデニレートキナーゼ, pHコントロールを独立したモジュールを用いて表現した.

23. 心筋Na/Ca交換の細胞質ATPによる活性化機序

松岡 達, 藤岡靖忠, 野間昭典(京都大学・大学院・医学研究科・生体制御医学講座・細胞機能制御学)

細胞質ATPはNa/Ca交換を活性化するが, その効果は実験条件により異なる. 生理的細胞膜におけるATPのNa/Ca交換活性化機序を解明する目的で, モルモット心室筋細胞から剥離したinside-outマクロパッチにおいてNa/Ca交換電流($I_{\text{Na/Ca}}$)を記録した. 細胞質側ATPは可逆的に $I_{\text{Na/Ca}}$ を増強した. $I_{\text{Na/Ca}}$ に対してAMP-PNPは効果がなかったが, ATP- γ SはATPの約30%の増強効果があった. Protein phosphatase 阻害剤であるvanadateは, ATP存在下のみ $I_{\text{Na/Ca}}$ を増強した. protein tyrosine phosphatase 阻害剤であるbpV (phen)は, vanadateと同様にATPの作用を増強し, ATP除去後の $I_{\text{Na/Ca}}$ 減衰を抑制した. $I_{\text{Na/Ca}}$ に対するATPの効果は, 細胞質側に投与したYersinia protein tyrosine phosphataseにより約20%減少し, protein tyrosine kinase inhibitorであるgenisteinで約40%抑制された. 上記結果から, ATPのNa/Ca交換活性化の約30~40%に, tyrosineリン酸化・脱リン酸化が関与していることが示唆された.

24. 心筋L型Caチャンネルの不活性化モデル

野間昭典, 松岡 達, 皿井伸明(京都大学・大学院・医学研究科・生体制御医学講座・細胞機能制御学)

L型Caチャンネルは, 心筋の膜興奮と収縮制御にとって最も重要である. その役割を定量的に解析するには, 心筋細胞モデルを使用する必要があるが, これまでのモデルでは, L型Caチャンネルの不活性化についてのモデルが不完全で, 信頼できる解析が困難であった. 即ち, 不活性化は電位依存性とCa依存性の二つのメカニズムによっていることは定性的に確立しているが, 定量的な記載は極めて限

られている。我々は、Shirokov (1993) のモデルを採用して、膜電位固定実験データ、活動電位波形、興奮収縮連関に関するデータを最も良く再現するよう改変し、我々のKYOTOモデルに組み込んだ。Shirokovモデルでは、チャンネルを通過するCaによるチャンネル開口部局所におけるCa濃度変化に依存して不活性化が起きると仮定している。このCa感受性を高くすることによって、外液Ca濃度上昇による心室筋活動電位持続時間の短縮、連続刺激による収縮の増大と飽和、ペースメーカーリズムの上昇を再現できた。外液Na濃度現象で記録される収縮力増強についても、改良モデルでよく説明できた。

25. 心筋細胞G蛋白制御カリウムチャンネルのRGS蛋白による電位依存性活性調節 (relaxation-gate)

倉智嘉久, 石井 優, 稲野辺厚 (大阪大学・大学院・医学系研究科・情報薬理学)

アセチルコリンにより誘発される心筋細胞G蛋白制御カリウム (KG) チャンネル電流は、relaxationと呼ばれる電位依存性の変化を示す。relaxationでは、KGチャンネル活性が膜の脱分極によって時間依存性に低下し、過分極によ

って徐々に増大する。この現象は20年以上前から知られていたが、その成立機序はまったく不明であった。我々は、この現象が、RGS (Regulators of G protein signaling) 蛋白がG蛋白サイクルを電位依存性に制御しているために起こっていることを見出した。RGS蛋白は3量体G蛋白のGTPase活性を促進し、G蛋白活性を抑制する蛋白である。心筋細胞では、脱分極による細胞膜を介したCa²⁺流入により、Ca/カルモジュリン複合体が形成され、RGS蛋白へ結合・活性化し、G蛋白のGTPase活性を促進する。このため、脱分極電位では活性化G蛋白量が減少、KGチャンネル活性が減少する。さらに、(1) RGS蛋白にはPIP3が結合し、その活性が抑制されていること、(2) このPIP3-RGSにCa/CaMが結合すると抑制が解除され、RGS蛋白のGTPase促進活性が顕在化する、ことを明らかにした。つまり、KGチャンネルのrelaxationは、膜電位によっておこるG蛋白活性変化を直接反影したものであった。以上、膜興奮現象がG蛋白活性の生理的制御因子の一つとなっているという、従来はまったく見過ごされてきた新しい細胞シグナル調節機構の存在が明らかとなった。