

## 第55回中国四国地方会

会 期：平成15年（2003年）10月31日（金）

場 所：倉敷市立美術館 講堂

当番幹事：川崎医科大学生理学教室

参 加 者：116名

中国四国地方会も今回で第55回を迎えた。本年度は演題数が26と例年に比べて多く、また参加者数も116名と多かった。これは倉敷という地理的な利便性が反映されたと思われる。また、当日は昨年に続き発表を液晶プロジェクタのみとした。35 mm スライドを利用する学会が急速に減少していることもあり、目立ったトラブルも無く進行もスムーズであった。いずれの発表も活発な議論がなされた。

本地方会が中国四国地区の生理学研究者の交流の場、また学部学生など若手の活躍を支える場として会のますますの発展を祈る。

今回の当番幹事は香川大学医学部形態・機能医学講座の予定。

### 1. 分子血流トレーサ法を用いた人工赤血球 Neo Red Cell (NRC) の局所心筋灌流分布評価

武本麻美<sup>1</sup>、松本健志<sup>2</sup>、浅野誉久<sup>3</sup>、立花博之<sup>1</sup>、小笠原康夫<sup>1</sup>、梶谷文彦<sup>4</sup>、緒方嘉貴<sup>5</sup>、木村哲寛<sup>5</sup>（<sup>1</sup>川崎医科大学医用工学教室、<sup>2</sup>大阪大学大学院基礎工学研究科 機能創成専攻 生体機械科学講座、<sup>3</sup>川崎医科大学核医学教室、<sup>4</sup>岡山大学大学院医歯学総合研究科 システム循環生理学、<sup>5</sup>テルモ株式会社 研究開発センター）

近年、出血性ショック急性期にも対応できる輸血代替物として人工血液に期待が寄せられている。その一例として、ヒト赤血球中のヘモグロビンを精製し、脂質の膜に封入した人工赤血球 Neo Red Cell (NRC) の開発が推進されている。NRCの粒子径は人赤血球の約1/40で、ヘモグロビン濃度は人血液の1/2であるが、組織への酸素供給能がヒト血液の約2~3倍あり、in vivo 実験においてNRCが人赤血球を上回る代謝改善機能を有する事が確認されている。そこで今回我々は、NRCの機能を評価する上で局所灌流に注目してみた。

人工呼吸器で呼吸管理を行い、血液ガスデータを生理的条件下に調節したWistar rat（雄、10-14週齢）にNRCを投与した群（n=6）とNRC非投与群（n=6）それぞれの左室心筋壁切片（10μm厚、28枚/心筋）における微小心筋灌流分布を、分子血流トレーサ法（分解能100μm）を用いて評価した。また、灌流分布パターンの評価には変動係数 $CV[\%] = (\text{ピクセル内HDMI密度の標準偏差} / \text{HDMI密度の平均}) \times 100$ を用いた。CVは4通りの分解能（100, 200, 400, 800μm）で求め、CVの空間分解能依存性についても検討した。

結果は、NRC非投与群では血流の多い領域と少ない領域が比較的是っきりと認識できる不均一な血流分布を呈していたのに対しNRC投与群は均一な血流分布を呈しており、CV値も全ての分解能においてNRC投与群が低値（=不均一性が低い）であった。

この結果より、酸素供給が局所的に十分でない急性心筋梗塞や冠微小循環障害等の病態でのNRC投与により、心筋への効率良い酸素供給が期待できる。

### 2. ペンシル型 CCD 生体顕微鏡システムを用いた in vivo 肺微小循環と個々の肺胞の同時可視化と機能解析

包 金花<sup>1</sup>、森本太郎<sup>1</sup>、岩崎達雄<sup>1</sup>、森實祐基<sup>1</sup>、梶谷昌史<sup>1</sup>、清岡崇彦<sup>1</sup>、宮坂武寛<sup>1</sup>、毛利 聡<sup>1</sup>、清水壽一郎<sup>1</sup>、平松 修<sup>2</sup>、小笠原康夫<sup>2</sup>、梶谷文彦<sup>1</sup>（<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯学総合研究科システム循環生理学、<sup>2</sup>川崎医科大学医用工学教室）

【目的】ペンシル型 CCD 生体顕微鏡を用い、in vivo にてラット肺胸膜直下微小循環を直接観察し、呼吸条件の肺循環へ及ぼす影響を解析する。

【方法】Wister ラットを人工呼吸管理下にて左胸壁第二肋間に小切開を加えて、顕微鏡先端を肺を圧迫しないように挿入し、マイクロイメージングを行った。生体顕微鏡の倍率は700倍、空間分解能0.51μm、時間分解能は30 frame/sec である。呼気終末陽圧（PEEP）や一回換気量を変化させ、赤血球の速度、肺胞の径について解析を行った。

【結果】肺毛細血管の肺胞に沿ったシート状の血流を生体において可視化した。また吸気終末にて肺胞内圧が上昇した際にも、毛細血管の一部が semi-collapse した際にも

血流は途絶えず、肺胞周囲毛細血管における Waterfall 現象の存在を確認した。換気量の影響については、1回換気量が2 mlのとき、肺胞径  $40 \pm 4.5 \mu\text{m}$ 、毛細血管内の赤血球流速は  $0.9 \pm 0.2 \text{ mm/sec}$ であったが、1回換気量を5 mlとすると肺胞径は  $88 \pm 10 \mu\text{m}$ と増加し、逆に赤血球速度は  $0.5 \pm 0.2 \text{ mm}$ へと著明に減少した。1回換気量5 ml、PEEP20cmH<sub>2</sub>Oの呼吸条件下では、毛細血管内だけでなく細動静脈の血流も吸気終末には停止し waterfall 現象がみられなくなった。

【結論】本システムにより人工呼吸管理下におけるラットの肺微小循環及び肺胞の動的イメージングがin vivoで成功し、呼吸状態と肺微小循環の関係が明らかとなった。

### 3. 超音波照射による超音波コントラスト剤破壊の微小循環への影響—Land-mine explosion in capillary

清岡崇彦<sup>1</sup>、高田建永<sup>3</sup>、平松 修<sup>2</sup>、水見直之<sup>2</sup>、望月精一<sup>2</sup>、小笠原康夫<sup>2</sup>、辻岡克彦<sup>2</sup>、森本太郎<sup>1</sup>、森實祐基<sup>1</sup>、廣田真規<sup>1</sup>、岩崎達雄<sup>1</sup>、宮坂武寛<sup>1</sup>、毛利 聡<sup>1</sup>、清水壽一郎<sup>1</sup>、梶谷文彦<sup>1</sup> (岡山大学大学院医歯学総合研究科 システム循環生理学,<sup>2</sup>川崎医科大学医用工学,<sup>3</sup>大阪市立大学大学院 循環器病態内科学)

背景：近年、超音波コントラスト剤（マイクロバブル：MB）と超音波（US）を併用することによる、drug delivery systemや遺伝子治療への応用が注目されている。目的：US照射による血管内MB破壊の微小循環への影響をペンシル型CCD生体顕微鏡にてin vivoで観察し、さらに組織での酸化ストレスの動態を評価した。方法：ラット（n = 42）骨格筋を用い、MB（Optison：Molecular Biosystems）を内径動脈より注入後、USをそれぞれmechanical indexes (MI) 0.1, 0.6, 1.0, 1.9の4強度で3分間照射した。この間およびUS照射後15分間通して毛細管血流を生体顕微鏡で観察した。US照射後15分時点での組織superoxide産生量をMI 0.1 + MB, MI 1.9 + MB, USのみ、MBのみの4条件で化学発光法により測定した。結果：MI 1.9 + MB時において毛細管破裂のリアルタイム像をとらえることに初めて成功した。MI 0.1, 0.6, 1.0, 1.9でそれぞれ毛細管の6.9%, 24.3%, 21.3%, 57.6%にno flowが認められた。no flowを生じた毛細管のほとんど(77.8%)は照射後15分の間に回復した。US照射のみではno flowは起こらなかった。またMBの注入のみでも、no flowはほとんど認められなかった。MI 1.9 + MBにおけるsuperoxideの産生量は他の3条件に比較して抑制されていた。結論：US照射による血管内MBの破壊は微小循環に影響し（毛細管破裂、一過性no flow）、その影響は高音圧時に強い傾向が認められた。高音圧のUS照射によ

るMB破壊は局所superoxideの代謝およびturnoverに関与する可能性が示唆された。

### 4. ヒト姿勢変化時にみられる毎分心拍出量ならびに末梢血管抵抗の応答

田村紫野、清平美和、松川寛二、村田 潤、中本智子、小峰秀彦、小林敏生（広島大学・医学部・保健学科）

立位をとると下半身に血液が移動するため静脈還流量が減少し毎分心拍出量（CO）が低下する。これを補償するために、高位中枢コマンドによるfeedforward調節ならびに心肺圧受容器や動脈血圧受容器そして筋活動に対する筋受容器からのfeedback調節が起こる。ヒトの能動的体位変換時にCOや末梢血管抵抗（TPR）を実測することは、姿勢変換に伴う循環調節を明らかにする上で重要であるが、これまで毎分心拍出量（CO）や末梢血管抵抗（TPR）を非観血的かつ連続的に計測することは困難であった。今回、Finometerを用いて動脈血圧（AP）を記録しmodel-flow計算からCO、1回心拍出量（SV）、TPRを求め、ヒト姿勢変化時にみられる心循環動態の経時変化を調べた。まず計測値の評価を行うため、安静時や階段昇降運動中のCOについて色素希釈法から算出した値と比較した。次に、随意的な起立と受動的なHead-up tilting（角度40°）におけるAP、CO、SVおよびTPRを計測し、能動的体位変化と受動的体位変化における循環調節の違いを検討した。さらに、足底の接地による下肢筋活動が血圧調節機構に与える影響を考察するため、支持板に足底を接したHead-up tiltingと牽引ベルトを用いて足部を浮かせたHead-up tiltingでの測定を行い心循環パラメーターを比較したので報告する。

### 5. HEAD-DOWN TILTがウサギの脳血流に及ぼす影響について

松尾 聡<sup>1</sup>、白石義光<sup>1</sup>、浅井泰雅<sup>2</sup>、植田圭吾<sup>2</sup>、河合康明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>鳥取大学医学部適応生理学,<sup>2</sup>脳神経内科学)

宇宙の微小重力環境あるいは模擬微小重力環境（HEAD-DOWN TILT, HDT）に暴露されると体液の頭方移動が起こる。その結果ヒトでは顔面浮腫や鼻閉が生じる。体液の頭方移動は脳血流に影響を及ぼす。経頭蓋ドップラー法を用いた研究では、HDT負荷時に中大脳動脈の血流速度は増加することが報告されている。一方SPECTによる研究で、黒質や小脳の血流は増加するが大脳皮質の血流は変化しないことが報告された。この研究ではHDT位で5分間の血流を観察している。従って経時的な血流の変化は不明である。体液移動による血管の自動調節能は持続的に脳血流に作用を及ぼしていると考えられるので、

HDT位の脳血流の経時的な変化を観察することは重要である。そこでHDT負荷の開始から1週間までの血流をウサギを用いて測定した。(実験1)麻酔下で1時間HDT位に維持した際の皮質内脳血流をレーザドップラー計で測定した。(実験2)測定用プローブを動物の脳に埋め込み、1週間HDT位に保ち覚醒時の脳血流を測定した。実験1では対照群、45°HDT群で脳血流の変化を認めなかった。75°HDT群で40分後から脳血流は減少した。実験2では1週間の45°HDTで血流の変化を認めなかった。以上の結果から1週間のHDT負荷において、ウサギの大脳皮質の脳循環は一定に保たれることが示唆された。

#### 6. 試作の超音波ドブラ血流速度計測装置による漸増漸減運動負荷時の血流動態

山口久雄<sup>1</sup>、田中弘之<sup>2</sup>、池原敏孝<sup>3</sup>、細川敬子<sup>3</sup>、平尾友二<sup>4</sup>、木内陽介<sup>4</sup>、吉崎和男<sup>3</sup>、宮本博司<sup>3</sup> (<sup>1</sup>徳島文理大・人間生活・運動生理、<sup>2</sup>鳴門教育大学・生活・健康系、徳島大・<sup>3</sup>医・病態予防医学・分子細胞生理、<sup>4</sup>工・電気電子)

循環器系疾患の兆候やその発症は安静時よりも身体活動時に頻発するため、運動中の血流動態をリアルタイムで観察できる装置は大変有用である。演者らは、2 MHzの連続波超音波ドブラ法を用いて、人体の頸動脈において、動脈血流速度分布を平均化することなく時間経過に追隨して連続的に同時測定が可能なシステムを試作してきた。今回は、運動時の測定誤差要因となる血管外組織から発生するノイズや血管位置の移動等の問題に対応できるように超音波の送受信トランスデューサに改良を加えるとともに、LabVIEWの導入により大量データ処理の簡素化と迅速化を図り、トレッドミル歩行による漸増漸減運動負荷時の血流動態について、サンプリング周波数25 kHz (20.48 ms)で連続測定を実施した。その結果、血管位置の移動に対応するために血流計測用超音波の照射範囲を広めたことに付随して、運動強度の増大に伴うノイズ成分の混入が検出されたが、最大血流速度は運動負荷強度や被検者の鍛錬度を反映して推移するなどの知見が得られ、本装置の有用性が検証された。

#### 7. L-Arginine reverses gp91phox and p47phox expression induced by high salt in Dahl salt-sensitive rats

Shigemoto Fujii, Ling Zhang, Junsuke Igarashi, and Hiroaki Kosaka (Dept. of Cardiovasc. Physiol., Kagawa Med. Univ., Kagawa)

Derangements in the production and degradation of reactive oxygen species (ROS) as well as nitric oxide (NO) have been implicated in the cardiovascular diseases. We

here explored how supplement with L-arginine, a NO synthase substrate, restores such derangements of ROS/NO systems in Dahl salt sensitive hypertensive (DS) rats. We detected an increase of NADPH oxidase activity, a key enzyme that produces superoxide, in the membrane fraction of renal cortex derived from DS rats loaded with high salt for 4 weeks; high salt loading also remarkably increased urinary H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8-isoprostane and thromboxane B<sub>2</sub> excretion, and decreased plasma NO end products. These changes by high salt loading were counteracted by oral L-arginine supplement. We further examined expression patterns of NADPH oxidase subunits in renal cortex derived from these animals. High salt-loading increased gp91phox and p47phox, but not p22phox or rac1, mRNA and protein abundance, which were counteracted with L-arginine supplement. These results disclose that high salt loading causes a deficiency in available L-arginine amounts for NO synthases and induces NADPH oxidase activation in the renal cortex of DS rats, which L-arginine supplement markedly restores. Since superoxide rapidly eliminates NO that inhibits sodium reabsorption in the cortical collecting duct, superoxide production due to up-regulated NADPH oxidase activity in the renal cortex of high salt-loaded DS rats may accelerate sodium reabsorption and hypertension.

#### 8. ブタ冠状動脈におけるカルシウム非依存性収縮に対するEPA (eicosapentaenoic acid)の立体構造による作用の違い

津本麗奈<sup>1</sup>、岸 博子<sup>1</sup>、野口亮子<sup>2</sup>、宮下和夫<sup>2</sup>、Hongyan Wang<sup>1</sup>、最上紀美子<sup>1</sup>、三輪さおり<sup>1</sup>、小林 誠<sup>1</sup> (<sup>1</sup>山口大学・医学部・医学科・器官制御医学講座・分子細胞生理学、<sup>2</sup>北海道大学大学院・水産科学研究科・生命資源科学専攻・生物資源化学講座)

Rho-kinaseを介する血管平滑筋のカルシウム非依存性異常収縮は、血管攣縮などの血管病の原因として注目されている。我々はこれまでに、SPC (sphingosylphosphorylcholine)が、血管平滑筋の細胞質カルシウム濃度を変化させることなく、Rho-kinaseを介してカルシウム非依存性異常収縮を引き起こす事を発見した。さらに、この経路によるカルシウム非依存性収縮を特異的に阻害する物質として、EPA (eicosapentaenoic acid)を同定した。今回我々は、SPCに加えて、生理的な血管収縮に対するEPAの効果を検討した。生理的な血管収縮刺激として、高カリウム液(膜脱分極によるカルシウムチャネルの活性化を引

き起こし細胞質カルシウム濃度を増加させ、カルシウム依存性収縮を引き起こす) およびU46619 (G protein 共役型受容体アゴニスト) の2種類の刺激を選び、SPCに対する効果と比較検討した。ブタ冠状動脈の平滑筋条片に fura 2 を負荷し、細胞質カルシウム濃度と収縮の同時測定を行った。血管条片を上記3種の刺激によって収縮させ、収縮が定常状態に至った時点でEPAによる弛緩効果を観察した。EPAは、SPCおよびU46619による収縮を抑制したが、高カリウム液による収縮には無効であった。さらに、EPAの立体構造とこれらの血管作用との関係について検討したので、報告する。

### 9. 機能的プロテオミクスを用いた血管異常収縮のシグナル分子の検索

岸 博子, 津本麗奈, 中山仁美, Hongyan Wang, 佐藤正史, 最上紀美子, 小林 誠 (山口大学・医学部・医学科・器官制御医科学講座・分子細胞生理学)

(目的) Rho キナーゼ (ROK) を介した血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮は、血管攣縮などの血管病の本態として注目されている。我々は、その上流の因子としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定し、さらに、SPCが、Srcファミリー・チロシンキナーゼ (Src-TK) の活性化を介してROKを活性化する事を見出した。今回は、Src-TK依存性のチロシンリン酸化レベル変化を指標に、質量分析計を用いて、Src-TKの下流分子を網羅的に検索した。(方法) ブタ冠状動脈平滑筋をSPCで収縮させ、種々の時間経過で標本を液体窒素で急速凍結・粉碎してlysateを作成し、抗リン酸化チロシン抗体RC20でWestern Blotを行い、SPC刺激によってチロシンリン酸化レベルが変動し、かつ、その変動がSrc-TKs阻害剤 (PP2, EPA) で抑制される蛋白分子群をMALDI TOF-MSで解析し、ペプチド・マス・フィンガープリンティング (PMF) 法によって同定した。(結果) SPC収縮に伴い、p60は経時的にチロシンリン酸化、p25はチロシン脱リン酸化された。更に、PP2およびEPAは、これらのp60およびp25のチロシン脱リン酸化レベルの変動を収縮と同様に抑制した。質量分析によるPMF法では、p60は、SH2ドメインを持つ蛋白やAnchoring filament proteinと考えられた。

### 10. MAPキナーゼの新しい基質 Mnk1 の血管平滑筋細胞における機能

石田万里<sup>1</sup>, 石田隆史<sup>2</sup>, 茶山一彰<sup>2</sup>, 宮川 清<sup>1</sup>, 吉栖正生<sup>2</sup> (<sup>1</sup>広島大学原爆放射線医科学研究所, <sup>2</sup>広島大学大学院医歯薬学総合研究科)

アンジオテンシンII (AII) は血管平滑筋細胞や心筋細胞に対して強力な肥大作用を有するがその詳細なメカニズムは不明である。最近MAPキナーゼの新たな下流分子/基質としてセリン/スレオニンキナーゼMAP kinase signal integrating kinase 1 (Mnk1) が発見され、その基質のひとつは蛋白への翻訳開始に関与する分子eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) であることがわかった。このことからMnk1がAIIによる蛋白合成/細胞肥大作用に関与することが強く示唆される。そこで今回我々は血管平滑筋細胞においてAIIによりMnk1が活性化されるか、またその活性化がeIF4Eのリン酸化に関与しているか否か、さらにその活性化のシグナル伝達経路を検討した。ラット培養血管平滑筋細胞においてMnk1はAIIにより5分以内に活性化され、eIF4Eは10分でリン酸化を受けた。Mnk1のドミナントネガティブフォーム (DN) を細胞に導入することによってeIF4Eのリン酸化は阻害された。Mnk1とeIF4Eの活性化はPD098059によって完全に阻害されたがSB202190によっては阻害をうけず、Mnk1の活性化にはERKが必要であることが示唆された。その上流のsmall G proteinに関してはRas, Rho, Rac, Cdc42のDNのうち、DN-Rasのみが完全にMnk1の活性化を抑制し、RasがMnk1/eIF4Eの活性化に関与していることが明らかとなった。以上より、AIIはMnk1, eIF4Eを活性化し、その活性化にはRas-ERKのシグナル経路に関与していることが明らかとなった。

### 11. Neural Reflex Hypotension Induced by A Very Small Dose of Hypertonic NaCl Solutions in Rats

Dongmei Zhang<sup>1</sup>, Motonori Ando<sup>1</sup>, Mitsuhiro Saita<sup>1</sup>, Yoshihiko Kakinuma<sup>1</sup>, Fumiyasu Yamasaki<sup>2</sup>, Takayuki Sato<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Control, Kochi Medical School, <sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory, Kochi Medical School)

Purpose. The intravenous infusion of 7.2-7.5% hypertonic saline (HTS) at a rate of 1 ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for 4-5 min is widely used as the initial therapy of hypovolemia, while it is well documented that the intravenous bolus injection of HTS induces a transient hypotension in animals and humans. However, the underlying mechanisms of the depressor response remain to be controversial. Here we reported that a slow infusion of a very small volume of 2-10% HTS at a rate of 0.3 ml kg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> for 1 min produced a marked depressor response by 15-60 mmHg through a neural reflex mechanism.

Methods. Anaesthetized rats weighing 280-330 g were

used. Before bilateral cutting of vagi and aortic depressor nerves and isolation of both carotid sinuses, the following concentrations of NaCl solutions were infused into the femoral vein at a rate of  $0.3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  for 1 min with the syringe pump: 0.97%, 1.5%, 2%, 4%, 6% and 9.7%. According to the same protocol of NaCl solutions, 5.7% and 39.8% glucose solutions were administered intravenously. In the other set of animals, differences between the systemic arterial pressure (SAP) responses to intravenous and intraaortic infusions of 9.7% NaCl solutions were compared. Next, we studied the SAP response to the intravenous infusion of 9.7% NaCl solution before and after bilateral vagotomy. To investigate the effect of the arterial baroreflex on the HTS-induced hypotension, the SAP response under the closed- and open-loop conditions of the arterial baroreflex while intravenously infusing 9.7% NaCl solution were measured. Finally, to examine whether the HTS-induced hypotension was mediated through sympathetic efferents, we estimated the effect of bretylium tosylate, postganglionic sympathetic blocker, on the SAP response in the vagotomized rat under open-loop conditions of the arterial baroreflex ( $12 \text{ mg kg}^{-1}$ , I.V.), while intravenously infusing 9.7% NaCl.

Results. The relationship between the magnitude of the depressor response and the concentration of HTS indicated that there was a threshold concentration of HTS for the depressor response between 1.5 and 2%, and that the magnitude of response increased in a concentration-dependent manner. However, such a depressor response was not evoked by physiological saline or 39.8% glucose which is equivalent to 9.7% NaCl solution in osmolality. The magnitude of the depressor response to intravenous HTS was significantly larger than that to intraaortic HTS ( $60.74 \pm 3.73$  vs.  $40.40 \pm 2.29$  mmHg,  $n=8$ ,  $P<0.05$ ). The response time to intravenous HTS was significantly shorter than that to intraaortic HTS ( $8.83 \pm 1.17$  vs.  $14.17 \pm 1.47$  sec,  $n=8$ ,  $P<0.05$ ). There was no significant effect of vagotomy on HTS-induced hypotension. There was significant difference in the depressor response with and without function of carotid sinus baroreflex ( $62.11 \pm 5.69$  vs.  $78.43 \pm 5.79$  mmHg,  $n=8$ ,  $P<0.05$ ). The intravenous infusion of 9.7% NaCl solution evoked no depressor response after the pharmacological blockade of the sympathetic efferent limbs. Recording of the renal nerve activity confirmed that the depressor response to intravenous HTS

was the neural reflex with sympathetic vasomotor efferents.

Conclusions. A very small dose of intravenous HTS elicits a neural hypotension via sympathetic inhibition.

## 12. マイクログリアの遊走能・食食能に関する機能分子の解析

今井嘉紀, Chuai Miao, 田中潤也 (愛媛大学・医学部・第一生理学)

マイクログリアは脳実質細胞の5-10%をしめるグリア細胞であり、脳内免疫担当細胞として機能すると考えられている。マイクログリアは疾患・損傷時には反応性に活性化され、分裂・増殖し形態を変化させる。さらに、病巣部に遊走し、様々な物質を産生・分泌し、病原体・細胞残渣などを食食・除去することにより神経の機能維持・再生に関与すると考えられる。我々はこのマイクログリア活性化の細胞内分子機構を解明する目的で、遊走能・食食能に注目し解析を行なった。

遊走・食食はともにアクチン細胞骨格の動的な再構成により維持される。そこで、活性化マイクログリアの示す強い遊走能・食食能の基盤となるシグナル機構についてアクチン制御分子に着目して研究を進めた。Iba1は我々の見出したマイクログリア特異的カルシウム結合タンパク質であるが、Iba1と単量体Gタンパク質Racがマイクログリアの遊走・食食において協調的に機能し、重要であることがわかった。これらの分子の生細胞内での動態について、GFPによる可視化の技法などを用いてさらに解析を行なった。

## 13. リーリンは神経細胞の分化途中に起こるアポトーシスを抑制する

満田憲昭, 大久保信孝, 杉山博信, 前田信治 (愛媛大学・医学部・生理学第二)

【背景】リーリンは発生段階において、神経前駆細胞の移動を促進している。しかし正常な脳の発生には、生存すべき神経細胞の選別や成熟神経細胞への分化が必要である。また、P19細胞はレチノイン酸刺激により神経細胞様に分化するが、その途中で一部の細胞はアポトーシスを起こす。この系は発生段階の脳における神経細胞アポトーシスのモデルとして有用である。

【結果】1) 我々はリーリンがこのアポトーシスを抑制することを発見した。2) このリーリンの抗アポトーシス効果は、P-I-3 Kinase (PI3K) 阻害剤LY294002やSrc family kinase (SFKs) 阻害剤によりほとんど消滅した。3) またアポトーシス関連因子BADの136番目のセリン残基をア

ラニンに置換することによっても、ほとんど消滅した。4) PI3K 阻害剤の使用により、Raf-1/MEK/ERK 経路が活性化された。

【結論】リーリンはSFKs-PI3K-Akt経路を活性化することにより、BADの136番目のセリン残基をリン酸化し、分化途中の神経細胞のアポトーシスを抑制していることが示唆された。またこの経路とRaf-1/MEK/ERK経路とのクロストークの存在が示唆された。

#### 14. RNA interference による腫瘍転移抑制の新たな可能性

小野亮子<sup>1</sup>、松下正之<sup>2</sup>、松岡順治<sup>1</sup>、田中紀章<sup>1</sup>、松井秀樹<sup>2</sup> (岡山大学大学院・歯医学総合研究科・<sup>1</sup>消化器腫瘍外科、<sup>2</sup>細胞生理学)

RNA interference (RNAi) は、double strand RNA (ds RNA) を細胞内に導入することで、相同するmRNAをノックダウンする手法である。哺乳類においては21~23bpのshort interfering RNA (siRNA) を導入することで同様の効果が得られ、最近では新しい治療法として臨床面での応用も期待されている。今回われわれはFocal adhesion kinase (FAK) をノックダウンすることで腫瘍の転移抑制効果を得られるのではないかと考え、FAKに対するdsRNAを作成した。FAKは、細胞が細胞外マトリックス (ECM) に接着する部位である接着斑に存在するチロシンキナーゼであり、細胞のmigration, proliferation, apoptosisなど様々な現象に関与しており、癌細胞において過剰発現が認められるとの報告があり、特に浸潤・転移において関係していると考えられている。FAKのsiRNAを子宮頸癌の細胞株であるHela細胞にtransfectionし、Western blotを行ったところFAKの発現を抑制することを確認した。このsiRNAを用いてin vitro, in vivoでの浸潤・転移モデルについて研究結果および今後の可能性について報告する。

#### 15. 膀胱癌に対する膜透過性ペプチド (11R) を用いた p53 蛋白導入治療法の試み

井上 雅<sup>1,2</sup>、富澤一仁<sup>1</sup>、野崎邦浩<sup>2</sup>、松下正之<sup>1</sup>、横山光彦<sup>2</sup>、公文裕巳<sup>2</sup>、松井秀樹<sup>1</sup> (岡山大学大学院・歯医学総合研究科・<sup>1</sup>細胞生理学、<sup>2</sup>泌尿器病態学)

【目的】我々は、11個のアルギニンからなるペプチド (11R) を蛋白の末端に付加することにより、目的蛋白を細胞内に導入・機能させる方法を確認した。今回、11Rを結合させたp53蛋白を直接膀胱癌細胞内へ導入し、その増殖抑制効果について検討した。【方法】p53変異型膀胱癌由来細胞 (J-82, T24) に11R-p53, p53遺伝子を組み込ん

だアデノウイルス (Ad-p53) を導入し、それぞれの増殖抑制効果についてWSTアッセイを用いて比較検討した。更に、抗癌剤 (CDDP) と併用によりCDDPのアポトーシス誘導効果が増強されるか検討した。さらに、*In vivo*において、11R-p53が膀胱腫瘍内に導入されるかマウスを用いて検討した。【結果】いずれの膀胱癌細胞においても、11R-p53濃度0.1 $\mu$ M以上で癌細胞増殖抑制効果を認め、0.5 $\mu$ Mを加えた群では、Ad-p53 (20MOI) を感染させた群と同等、もしくはそれ以上の癌細胞増殖抑制効果を認めた。さらに、11R-p53は、*In vivo*においてもマウス膀胱腫瘍内にも効率よく導入された。CDDPで誘導される癌細胞のアポトーシスを有意に増強する効果も認められた。しかし11R-p53は効率よく細胞内に導入されるが、24時間以内に分解され反復投与が必要であった。【結語】11Rを用いたp53蛋白細胞内導入法は、今後11R-p53の長期安定化を図る必要があるものの、経尿道的にも実施可能と思われる、新たな治療戦略の開発につながるものと期待される。

#### 16. カルモデュリンキナーゼIによるリン酸化を介した神経型NO合成酵素の活性制御

宋 涛、波多野直哉、堀井真理子、徳田雅明、渡邊泰男 (香川大学・医学部・細胞情報生理学)

【目的】構成活性型カルモデュリンキナーゼI (CaMK $\alpha$ ) のリン酸化により神経型NO合成酵素 (nNOS) の活性が阻害される知見を踏まえて、キナーゼとNOのシグナルの新しいクロストークを解析することを今回の目的とした。【方法】質量分析、ペプチドマップ、点変異酵素を用いた責任リン酸化部位の同定ならびに、阻害様式の検討。新規作成部位特異的認識リン酸化抗体を用いた遺伝子導入細胞におけるリン酸化シグナルの解析。【結果】確認された4つのリン酸化残基のうち、責任リン酸化部位はnNOSのCaM結合部位内のSerine741であり、阻害様式はCaM結合抑制であった。活性阻害は遺伝子導入細胞においても観察され、野生型CaMK $\alpha$  Iによってもこのリン酸化は触媒された。他のCaMK $\alpha$  (II, IV) ならびにAキナーゼ、Cキナーゼによっては、それぞれ細胞内、試験管内においてリン酸化されなかった。【考察】我々はこれまでにCaMK $\alpha$  IIがnNOSのSerine847のリン酸化を介してnNOSの活性を制御することを培養神経細胞、ラット虚血海馬において解析してきた。本研究によりCaMK $\alpha$  IのSerine741リン酸化による新しい活性調節機構の存在が示唆された。現在、このリン酸化の組織、細胞内における生理的意義を検討中である。

## 17. マウス後根神経節におけるTTX-感受性ナトリウム電流の不活性化機構

中本千泉<sup>1</sup>, 鄭 泰星<sup>1</sup>, 柿村順一<sup>1</sup>, 松富智哉<sup>1</sup>, 大石芳彰<sup>1</sup>, 仲田義啓<sup>2</sup>, 緒方宜邦<sup>1</sup> (広島大学大学院・医歯薬総合研究科・<sup>1</sup>神経生理学, <sup>2</sup>薬効解析科学)

後根神経節 (DRG) には7種類の電位依存性Naチャネルが発見し, 侵害情報を含むさまざまな感覚信号の伝搬に役割分担して機能していると考えられる. 侵害情報を伝搬するC線維を発する小型DRGニューロンにおいては, TTX-非感受性のNaチャネルであるNa<sub>v</sub>1.8およびNa<sub>v</sub>1.9が特異的に発現しているが, 大型DRGニューロンと同様にTTX-感受性の速いNa電流も観察される. 小型DRGニューロンにおける活動電位を担っているNaチャネルについては, これまでTTX-感受性Naチャネルであると一般に考えられてきた. しかし最近の報告によれば, TTX抵抗性の活動電位の存在も示されており, いずれのタイプのNaチャネルが機能的に重要なのかよく分かっていない. 今回, 私たちは, 大型および小型のDRGニューロンにおけるTTX-感受性Naチャネルの不活性化を比較検討することにより, C線維上の活動電位がTTX-感受性Naチャネルではなく, TTX-非感受性Naチャネルによって担われていることを明らかにした.

## 18. 正常体温ならびに低体温ラットの網膜電図に及ぼす虚血再灌流の影響

河合康明<sup>1</sup>, 堅野比呂子<sup>2</sup> (<sup>1</sup>鳥取大学医学部適応生理学, <sup>2</sup>同視覚病態学)

虚血再灌流時の網膜電図の変化を, 若年 (4ヶ月) および加齢 (18ヶ月) ラットを用いて, 正常体温 (38.5℃) ならびに低体温 (31.5℃) 条件下で観察した. **方法**: 網膜電図は, 白色閃光刺激により誘発し, 角膜に装着した銀塩化銀電極を用いて記録した. 眼血流はレーザードップラー血流計により測定し, 眼圧を15 mmHgから80 mmHgに上昇させることにより, 2時間の虚血負荷を行った. 直腸温をモニターし, 自作の冷却装置を用いて, 低体温に維持した. **結果**: 眼圧を80 mmHgに上昇させると, 眼血流は基準値の40~60%に減少した. 虚血中の網膜電図b波の振幅は, 若年ラット群では, 正常体温で基準値の60%まで, 低体温では70%まで減少した. 再灌流により基準値に回復したが, 回復に要した時間は, 正常体温で2時間, 低体温では1時間であった. 加齢ラット群では, 虚血中の減少は, 正常体温で基準値の39%まで, 低体温では55%までであった. 再灌流を行っても, 正常体温では6時間以内に基準値まで回復しなかったが, 低体温では4時間で回復した. **結論**: 以上の結果より, 1) 虚血に対するラット網膜

機能の耐性は加齢と共に低下する, 2) 低体温は, ラット網膜の虚血再灌流障害を弱源する保護作用を有することが示唆された.

## 19. 魚類網膜に遠心性に投射する終神経終末部より放出されるペプチド候補

藤本正昭<sup>1</sup>, 小田愛子<sup>1</sup>, 佐々木 至<sup>1</sup>, 筒井和義<sup>2</sup>, 小林牧人<sup>3</sup> (<sup>1</sup>鳥根大学・生物資源科学部・生物科学科, <sup>2</sup>広島大学・総合科学部・脳科学研究室, <sup>3</sup>国際基督教大学・理学科・生物学教室)

魚類の終神経は, 嗅球付近に細胞体を有し, その軸索は嗅索を経由し, 終脳から視神経に沿って網膜に遠心性に投射することが知られている. また, この終末は, 網膜の内網状層と内顆粒層の境界部に終わっており, 抗FMR-Famide抗体陽性であることが報告されている (Stell et al. 1984). 網膜内でのFMRFamideの存在は確認されていないことから, この結果はC末端部にRFamide残基を有する他のペプチドの存在を窺わせる. 最近Tsutsuiら (2002) はキンギョの脳にLPXRFamideが存在することを報告している. そこでわれわれは, 嗅索切断手術と抗体による免疫染色とを組み合わせて, このペプチドが終神経終末部より放出されている可能性について調べた. すなわち, キンギョを開頭し嗅索切断手術を施して19日後の網膜について, このペプチドを認識することが確認されているfGRP抗体により免疫染色を行った. その結果, 未処置あるいは偽手術群では, 斑点状の終末部が染色されたが, 嗅索切断群では, この染色が見られなかった. この結果は, 陽性終末部から放出されるペプチドは, 嗅球から輸送されていることを示しており, キンギョLPXRFamideは網膜内に終末する終神経の伝達物質として有力な候補であることを示唆する.

## 20. アドレナリンβ受容体作動薬の嗅球内注入がにおいの嫌悪学習に及ぼす効果

奥谷文乃, 張 敬姫, 梶 秀人 (高知大学・医・統合生理)

幼若ラットは古典的条件付けにより, 母性行動による体性感・刺激とともに対提示される母ラットのにおいを学習する. これをにおいの学習モデルとして, 生後11日めのラットに電撃とにおいを対提示すると嫌悪学習が成立し, そのにおいを避けるようになる. このメカニズムとして体性感・刺激によって活性化された遠心性ノルアドレナリン線維が, 嗅球内の僧帽細胞と顆粒細胞の樹状突起間シナプスに作用して, 僧帽細胞の脱抑制をひき起こすと考えられている.

さらにアドレナリン受容体のサブタイプを明らかにするために、各受容体拮抗薬を注入して学習成立への効果を観察した。すると $\beta$ 受容体拮抗薬のチモロールの注入は濃度依存性に学習成立を阻害した。また対提示トレーニングの1時間後にテストをおこなう短期記憶もチモロールの注入により阻害された。一方 $\alpha$ 受容体拮抗薬のフェントラミン注入は全く学習成立に影響を及ぼさなかった。さらに $\beta$ 受容体作動薬のイソプロテレノールの注入により、単独提示されたにおいに対して学習が成立するようになった。以上より、においの嫌悪学習成立には嗅球内アドレナリン $\beta$ 受容体が関与することが明らかとなった。

## 21. 視交叉上核破壊が暑熱馴化ラットの核心温日内変動におよぼす影響

丸山めぐみ, 原 俊子, 川北映輔, 橋本道男, 紫藤 治 (島根大学・医・環境生理学)

視床下部視交叉上核 (SCN) は核心温の日内リズム発生の中枢であることが知られる。また、一日のうち一定の時間帯に限る様式で暑熱に曝露され、これに馴化したラットでは、かつての暑熱曝露時間帯に一致して核心温が低下するよう、核心温の日内変動パターンが変化することが知られる。これらラットではSCNにおける神経活性マーカーである Fos 蛋白発現の日内変動パターンも変化していた。この結果は暑熱馴化による体温調節機能の変化にもSCNが関与する可能性を示唆する。そこで、本研究では一定時間帯に限定した暑熱曝露後の核心温の日内変動パターン変化にSCNが関わるか否かを検討した。電気的にSCNを破壊したラットを明暗周期下12:12時間、環境温23℃、自由摂食・摂食水下で飼育した。33℃の高環境温下に暗期後半の約5時間、10日間曝露することで暑熱馴化を得た。暑熱馴化前後の核心温をテレメトリーシステムにより測定した。SCNを破壊したラットでは体温の日内リズムは消失した。また暑熱馴化後では、一日の核心温レベルが低下したが、かつて暑熱に曝露されていた時間帯での明らかな低下はなかった。本研究よりSCNは暑熱曝露による体温低下をおこす馴化(適応)機構にほとんど影響しないが、温度負荷時間帯への記憶の成立に関与する可能性が示唆された。

## 22. サルの視床内臓感覚野

伊藤真一<sup>1,2</sup>, A.D.Craig<sup>2</sup> (<sup>1</sup>島根大学・医学部・生理学講座, <sup>2</sup>Div. Neurosurg., Barrow Neurol. Inst.)

迷走神経求心線維に由来する内臓感覚も、他の感覚と同様に、視床を経て大脳皮質に投射する経路を持つと考えられている。その経路として味覚と並行する上行路が推測さ

れているが、最もよく調べられているラットでも視床中継核は同定されておらず、一方サルでは味覚と異なる脳幹上行路があり、視床(も含めて)以上の経路は明らかになっていない。われわれはサルの視床内臓感覚中継核を同定するため、味覚中継核(視床基底腹内側核)近傍で迷走神経応答を検索した。ネンプータル麻酔下のカニクイザルで頸部迷走神経を電気刺激し、脳定位固定装置の座標に沿って刺入したタングステン電極で電場電位応答とマルチユニット応答を記録した。最も早い応答は陰性-陽性の2相性電位で(陰性電位のピーク潜時は約40 ms)、応答中心領域では、陰性電位のピークに重畳してマルチユニットスパイクが常に得られ、心拍に同期したバースト発火も時に見られた。この部位は基底腹内側核の内側端にあり(味覚中継核より吻内側)、手綱脚路の外側に隣接し、束傍核の直下に位置していた。味覚中継核と同じ核内であることから、ここが内臓感覚の中継核であって大脳皮質味覚野の近傍に投射することが予想される。

## 23. 腹部大静脈径に及ぼす水圧の影響

小野寺 昇 (川崎医療福祉大学健康体育学科)

目的: 生体は、水中において水の物理的な特性の影響を受け、陸上とは異なる生理的な応答を示すことがよく知られている。水圧は、静脈還流として循環器系に影響を及ぼすことが明らかになっている。水深に依存するものと考えられている。そこで、異なる水深における腹部大静脈径を測定し、水圧が循環器系に影響を及ぼす影響を明らかにした。方法: 健康成人男性7名(年齢 $21 \pm 1$ 歳, 身長 $174.8 \pm 4.2$  cm, 体重 $74.2 \pm 6.5$  kg)を被験者とした。実験に先立ち研究の意義, 目的, 得られる成果などを被験者に説明し, 参加の同意を得た。陸上条件と水中条件を設定した。さらに水深の違いから水中条件は3つの条件(剣状突起条件, 大転子条件, 腋窩条件)に分類された。浸水時間は, 5分とした。水温, 室温は, 30℃であった。腹部大静脈の横断面積は, 超音波エコー法(Bモード)を用いて把握した。同時に浸水時の脈拍を防水型心電計を用いてモニターした。結果及び考察: 脈拍数は, 水深に依存して有意に減少(陸上条件 $78.4 \pm 12$  bpm, 大転子条件 $66.6 \pm 10.3$  bpm, 剣状突起条件 $56.1 \pm 5.0$  bpm, 腋窩条件 $52.1 \pm 6.2$  bpm)した。心拍出量は, 陸上条件 $51.0 \pm 10.5$  ml, 大転子条件 $56.7 \pm 13.8$  ml, 剣状突起条件 $63.7 \pm 16.1$  ml, 腋窩条件 $67.6 \pm 10.7$  mlであった。陸上条件と腋窩条件に有意な差を認めた。これらのことは, 水の物理的な特性に循環器系が影響を受けることを示唆する。脈拍は, 水深に依存して減少した。しかしながら心拍出量は, 階段状の有意変化を示した。

## 24. ラットの橋排便反射中枢の所在と働き、糞塊を排出する蠕動の誘発機構

斎藤さな恵, 行本知世, 福田博之 (川崎医療福祉大学臨床栄養学科)

【目的】ヒトやイヌは大きな糞塊を一気に排出するが、ラットは小さな糞塊を逐次排出する。また、ヒトやイヌの骨盤神経は、壁内骨盤神経を形成し近側結腸まで支配しているが、ラットには壁内骨盤神経は存在しない。従って、ラットとイヌでは、遠位結腸・直腸の排便収縮を誘発する神経機構が相違しているものと考えられる。本実験は、その相違点を明らかにするために行った。【方法】実験は、クロラロース (20 mg/kg, i.v.) とペントバルビタール (16 mg/kg, i.v.) による麻酔下に中脳吻側で除脳したラット (280-350 g) でおこなった。下行結腸と直腸の収縮をバルーン・トランスデューサー法で記録した。排便反射は記録バルーンによる伸展と肛門管の電気刺激により誘発した。【結果】興奮性神経毒の微量注入により、イヌの橋排便反射中枢に相当する青斑核 $a$ と三叉神経運動核吻側部に介在する橋網様体を破壊すると排便収縮は消失した。また、両側骨盤神経切断により排便収縮は消失した。しかし、両処置後も小さな蠕動は残った。骨盤神経の遠心性刺激により人工糞塊を輸送する蠕動収縮が誘発された。【結論】以上の結果は、ラットの下行結腸・直腸の排便収縮は、橋排便反射中枢が骨盤神経を介して壁内蠕動反射弓を駆動することにより誘発されることを示唆する。

## 25. Enterochromaffin細胞から放出される5-HTによる排便反射の誘発

畑野瑞恵<sup>1</sup>, 齋藤さな恵<sup>2</sup>, 福田博之<sup>2</sup> (<sup>1</sup>川崎医科大学・生理学, <sup>2</sup>川崎医療福祉大学・臨床栄養学科)

【目的】癌の化学療法や放射線療法に伴い消化管粘膜のenterochromaffin (EC)細胞より放出された5-HTが、消化管支配迷走神経求心性線維末端の5-HT<sub>3</sub>受容体 (R)を刺激し、悪心や嘔吐を誘発すること、および、その悪心・嘔吐を5-HT<sub>3</sub>R拮抗薬で抑制すると便秘が起こることは良く知られている。これらの知見は、EC細胞からの5-HTが骨盤神経求心性線維末端の5-HT<sub>3</sub>Rを刺激し、排便反射を誘発している可能性を示唆する。今回、その可能性をEC細胞から5-HTを放出することが知られている腸伸展とcholera toxinの大腸運動促進効果に対する5-HT<sub>3</sub>R拮抗

薬 granisetron と骨盤神経切断の影響を観察する事により検討した。【方法】除脳ラットの下行結腸と直腸の運動をバルーン法で記録し、両バルーン間の結腸内腔を cholera toxin (0.2 mg in 1-ml saline) で灌流した。【結果】Cholera toxin および下行結腸バルーン伸展刺激による下行結腸・直腸の収縮は、granisetron (1 mg/kg, i.v.) および両骨盤神経切断により有意に抑制された。一方、肛門管刺激による下行結腸・直腸収縮は両骨盤神経切断により抑制されたが granisetron では抑制されなかった。【結語】以上の結果は、排便反射がEC細胞から放出される5-HTによる骨盤神経末端の5-HT<sub>3</sub>Rの刺激により惹起されていることを示唆する。

## 26. アポモルフィン投与ラットにおける自律神経反応と中枢経路

石浦佑一<sup>1</sup>, 古我知成<sup>1</sup>, 氷見直之<sup>2</sup>, 小橋 基<sup>3</sup> (<sup>1</sup>川崎医療福祉大学 リハビリテーション学科, <sup>2</sup>川崎医科大学生理学, <sup>3</sup>岡山大学大学院 歯学研究所)

ラットなどの齧歯類の動物は嘔吐能力を持たないことが知られている。しかし、催吐剤の投与によって、悪心を感じていることを示唆する多くの報告がある。今回、我々は、ウレタンクロラロース麻酔ラットに催吐剤であるアポモルフィンを静脈内もしくは最後野へ微量投与し、胃底部と胃体部の運動、血圧、心拍数、呼吸数、唾液分泌の動態について検討した。アポモルフィン投与により、(1)胃体部の一過性の運動抑制、(2)胃底部の持続性の内圧亢進、(3)唾液分泌の促進、(4)血圧下降と除脈、(5)呼吸頻度の一過性の抑制が観察された。また、ドーパミン受容体 (D<sub>2</sub>型)拮抗薬を最後野へ微量投与すると、胃に見られていた反応は完全に消失した。また、ニューロキニン受容体 (NK<sub>1</sub>型)拮抗薬を静脈内投与あるいは疑核周辺部へのマイクロインジェクションによって、胃底部の内圧亢進反応は消失したが、胃体部の一過性の運動抑制には影響を与えなかった。さらに、疑核周辺部のニューロンの一部は、アポモルフィンにより活動頻度が上昇した。これらの結果から、ラットにおいてもアポモルフィンは最後野、弧束核、および疑核周辺部のニューロンを次々に興奮させることにより、悪心に伴う自律反応が出現しているものと考えられた。