

第56回西日本生理学会

日 程：平成17年10月21日（金） 13：00～14：12 一般演題（6題）
 14：22～15：58 奨励賞対象演題（8題）
 16：08～17：20 一般演題（6題）
 17：30～ 評議委員会・総会
 （奨励賞表彰式）
 19：00～ 懇親会
 22日（土）09：00～12：58 一般演題（19題）

会 場：北九州国際会議場

当 番：九州歯科大学 生命科学講座 生理学分野

参加者：117名

演題数：39題

前回の第55回西日本生理学会大会で、「生理学会地方会の活性化と西日本生理学会の今後のあり方」について議論がなされ、今回以降の大会では以下の3つのことを行うことが了承されていた。(1) 大学院・学生の参加費を安価にし参加を促す。そのために、評議員・一般会員・学生と3段階の参加費設定とし、評議員に若干の参加費の負担増をお願いする。(2) 懇親会費も大学院生・学生は安くする。(3) 若手研究者の学会発表演題の中から優秀な発表に「西日本生理学会奨励賞」を出す、ということだった。この決定を基本に今大会の運営を行った。ただ、(2)については、会計に余裕があったことから、特に一般会員あるいは評議員に負担を求めるということには行わなかった。また、前回の大会から評議委員会を総会とは切り離して学会が始まる前に開催するというようになっていたが、今回奨励賞を設けたことから、その経過を見たくてで審議してもらったほうがよいのではないかと判断し、一昨年までと同じように評議委員会・総会を第1日目の口演終了後に開催した。評議委員会・総会では、「西日本生理学会奨励賞」に関する申し合わせ事項が承認された。西日本生理学会奨励賞への応募演題は8題あった。5人の審査委員により審査が行われ、演題番号8福岡大学医学部生理学の中村友紀先生、演題番号11長崎大学医歯薬・神経機能学分野の守屋孝洋先生が授賞された。審査の発表および授賞式を評議委員会・総会で行った。

一般演題を含め発表はすべて、PC、液晶プロジェクターで行ったが、大きなトラブルは一件もなく順調に運営できた。奨励賞を設け学会に新鮮味ができたことからか、活発な質疑応答が行われ大会が盛会であったと感じた。今回の当番校は、宮崎大学、次々回の当番校は九州大学の予定である。

1. ラット心筋芽細胞H9c2におけるアルドステロンの時計遺伝子 *Per1* の発現増強作用

田中協栄^{1,2}、芦澤直人²、瀬戸信二²、寺蘭英之¹、西原永潤¹、矢野捷介²、篠原一之¹（¹長崎大学大学院・医歯薬・神経機能学分野、²長崎大学大学院・医歯薬・循環器病態制御内科学）

近年末梢組織においても時計遺伝子が発現していることが明らかとなった。高血圧モデルラットにて *Per2* 遺伝子の発現が増加していると報告されるなど、時計遺伝子と循環器疾患の関連も疑われている。末梢組織の時計遺伝子は種々の因子により発現制御されているが、その制御因子は

臓器、組織により大きく異なり、心筋においては十分検討されていない。そこで我々はラット心筋芽細胞H9c2を用いて、アルドステロンによる時計遺伝子 *Per1* の発現変化をRT-PCR法によって検討した。アルドステロンは投与2時間後において一過性に *Per1* の発現量を増加させ、4時間後、8時間後ではコントロールと差は認めなかった。またアルドステロン拮抗薬のスピロラクトン前投与はアルドステロンの *Per1* 発現増強作用を有意に抑制した。以上よりラット心筋芽細胞においてはアルドステロンが時計遺伝子 *Per1* の発現制御因子の一つと考えられ、その作用はスピロラクトンで抑制されることから mineralocorticoid

receptor を介した機序であると推測された。

2. ビデオと PC を利用した単離心筋細胞の収縮解析システムの開発

塩谷孝夫 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

心筋の生理や病態生理の研究において、細胞収縮の観察は重要な実験技術である。単離心筋細胞でのパッチクランプ法との併用を考えると、細胞収縮をシンプルな装置で簡単に定量できることが望ましい。そこで、市販の汎用ビデオカメラを用いて心筋細胞のビデオ画像を PC に取り込み、デジタル化した画像をソフトウェア (Scion Image) で解析することにより無負荷状態における細胞収縮を測定するシステムを開発した。アルゴリズムの工夫によってパッチ電極の影が測定に与える影響は最小限であり、1/60 秒の時間分解能で収縮を定量できた。このシステムを用いて、ニスタチン穿孔パッチ法によりカレントクランプしたマウス単離心室筋細胞から活動電位と細胞収縮を同時記録した。細胞の収縮波形は安定に記録でき、5Hz (300BPM) の頻度で刺激したとき、その収縮振幅は $6.9 \pm 0.7\%$ (mean \pm sem, $n = 25$) であった。刺激の頻度を 1-8.3Hz (60-500BPM) の範囲で変化させて収縮を記録したところ、頻回刺激で収縮振幅が減少する負の階段現象が観察された。この所見は従来の報告と一致していた。このシステムは、心筋細胞におけるパッチクランプと細胞収縮の同時記録に有用であり、また、他の細胞の変形測定にも応用できると考えられた。

3. 細胞外アシドーシス刺激による心筋クロライド電流の活性化

山本信太郎, 穎原嗣尚 (佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理)

これまで、非興奮性細胞では細胞外アシドーシス刺激で活性化されるクロライド電流 (I_{Clacid}) が報告されている。今回我々はマウスおよびモルモットの心筋細胞に I_{Clacid} を興奮性細胞としては初めて見出し、その特性を検討した。細胞外アシドーシス (pH 7.0 以下) で、この電流は強い脱分極側では時間依存性に活性化され、細胞内外クロライド濃度の等しい条件で外向き整流性の電流-電圧関係を示した。逆転電位は様々なクロライド濃度の平衡電位に一致し、クロライドチャンネル抑制剤 (DIDS, glibenclamide, niflumic acid) の感受性を認めた。細胞内外のカルシウムには非感受性であった。低浸透圧刺激は I_{Clacid} を抑制した。一方、心筋 CFTR クロライド電流は細胞外アシドーシスで抑制された。以上の実験結果から、 I_{Clacid} は既知の心筋クロ

ライドチャンネルとは異なるチャンネルを介した電流と考えられた。

4. L 型 Ca チャンネルの活性はどのようにして維持されるか?

郝麗英, 徐建軍, 袁部悦子, Zahangir A. Saud, 王午陽, 韓冬雲, 亀山正樹 (鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・神経筋情報生理学分野)

L 型 Ca チャンネル (Cav1.2) の活性は、inside-out パッチ移行により低下・消失する (run-down 現象)。我々は、この run-down の機序とチャンネル活性維持機構を解明する目的で、単離心室筋細胞を用いた研究を行った。チャンネルの run-down は、fast mode (始めの約 2 分間) と slow mode の二相より成り、fast mode run-down の逆転は、カルモジュリン (CaM, $0.3 \mu M$) と ATP ($3mM$) により可能であった。この CaM の効果は、Ca 結合部位である EF-hand 領域 4 か所全てに変異を導入した型 (Glu32Ala, Glu68Ala, Ser102Phe, Glu141Ala) でも保たれることから、Ca-free CaM (apoCaM) によるものと結論された。なお、ATP の作用は非水解性アナログの実験等により水解を伴わない作用 (例えばサイトへの結合) と推定されている。一方、Fast mode から slow mode への移行は、オキサ酸 (蛋白 phosphatase 阻害剤) や蛋白キナーゼ (CaMKII または PKA) + ATP で阻止された。以上の結果は、L 型 Ca チャンネルの活性がチャンネルリン酸化と CaM 及び ATP の直接作用により維持されるという仮説を強く支持する。

5. I 型及び II 型糖尿病モデルラットにおける心室筋 Na/Ca 交換系の比較

砂川昌範¹, 加藤隼悟², 粟澤剛², 花城和彦¹, 中村真理子¹, 小杉忠誠¹ (¹ 琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野, ² 同医学科 5 年生)

【目的】糖尿病心臓では、心室拡張障害に伴う心収縮力低下が生じる。細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの破綻がその原因とされている。なかでも、 Na^+/Ca^{2+} 交換系 (NCX) の活性低下が注目されている。糖尿病病態での心室筋 NCX 機能低下の機序を解明するために、I 型及び II 型糖尿病モデルラット心室筋 NCX 電流特徴を比較した。【方法】Sprague-Dawley ラット尾静脈内にストレプトゾトシン ($65mg/kg$ 体重) を投与し、I 型糖尿病モデルを作製した。II 型糖尿病モデルには、OLETF ラットを用いた。摘出心臓をコラゲナーゼ溶液で灌流し、単離心室筋細胞を調整した。電圧固定下に、ランプパルスを細胞に与え、NCX 電流を測定した。さらに、NCX 電流の理論式を用いて、測定データより各種パラメータを算出した。【結果】I 型及

びII型糖尿病ラット心室筋NCX電流共に -80mV (forward mode) 及び $+40\text{mV}$ (reverse mode) での電流振幅に有意差はみられなかったが、I型糖尿病ラット心室筋NCX電流のforward modeの減少傾向がみられた。算出したパラメータ値に有意差は見られなかった。【結論】Insulin分泌低下が、心室筋NCX活性を低下させている可能性が示唆された。ラット心室筋NCX電流は、非常に小さく、糖尿病によるラット心室筋NCX機能低下の証明が困難であった。

6. ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおいて脳内PrRP産生は低下する

米良貴嗣¹, 斎藤 淳¹, 藤原広明¹, 川崎 展¹, 橋本弘史¹, 岡 孝和², 辻 貞俊², 上田陽一¹ (¹産業医科大学・第一生理学, ²神経内科学)

【目的】Prolactin-releasing peptide (PrRP) はプロラクチンの放出作用だけでなく、摂食抑制作用やエネルギー代謝への関与が報告されている。今回、我々はストレプトゾシン (STZ) 誘発糖尿病ラットを用いて高血糖状態が脳内PrRP産生にどのような影響を与えるかを検討した。【方法】STZ溶解液 (80mg/ml) をウイスター系成熟雄ラットに腹腔内投与 (1ml/kg体重) した。またコントロールラットとして同量の生理食塩水を腹腔内投与した。糖尿病ラット (血糖値 $>16.6\text{mmol/l}$) にはSTZ投与3週間後よりインスリン皮下注射 (10-12U/ラット, ヒューマリンN) または同量の生理食塩水皮下注射を7日間行った。コントロールラットも同時期に同量の生理食塩水を皮下注射した。STZ投与4週後に断頭、凍結脳切片を作成しin situハイブリダイゼーション法にて視床下部および延髄PrRP mRNAを検出した。【結果】糖尿病ラットの生理食塩水投与群の視床下部および延髄におけるPrRP mRNAレベルはコントロール群と比べ有意に減少した。インスリン投与群では血糖値は正常レベルになっており、視床下部および延髄におけるPrRP mRNAレベルはコントロール群とほぼ同程度で有意差がなかった。【結論】ラットの脳内PrRP産生は高血糖状態によって影響を受けることが示唆された。

7. 心筋細胞における Na^+ , K^+ -ATPaseサブユニット構成とその役割

原田景太, 遠藤 豊, 井上真澄 (産業医大・医・第2生理)

我々は以前、副腎髄質細胞において Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$ サブユニットは $\beta 3$ とダイマーを形成し細胞膜に広く分布すること、 $\alpha 2$ は Ca^{2+} 貯蔵部位近傍の細胞膜に $\beta 2$ と局在

することを見出した。しかしながら、各サブユニットの細胞膜表面における局在機構やその役割は十分には解明されていない。これを明らかにするために、本研究ではラットおよびモルモットの心室細胞における Na^+ , K^+ -ATPase α , β サブユニットの構成および局在を生化学・分子生物学的手法を用いて明らかにし、その役割を検討した。その結果、ラット、モルモット心室筋において、 Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$, 2 , 3 , および $\beta 1$, $\beta 2$ サブユニットの発現が確認された。また、 $\alpha 1 \cdot \beta 1$, $\alpha 2 \cdot \beta 1$, $\alpha 3 \cdot \beta 2$ の組み合わせでダイマーが形成され、 $\alpha 1 \cdot \beta 1$ はsurface sarcolemmaおよびtransverse tubulesに、 $\alpha 2 \cdot \beta 1$ はtransverse tubulesに、 $\alpha 3 \cdot \beta 2$ はintercalated discに主に局在することがわかった。 $\alpha 2$ サブユニットは筋小胞体内部およびその周辺の局所的 Ca^{2+} 濃度調節に関わっていることが示唆された。

8. 脳型KCNQ3変異体のチャネル機能解析

中村友紀¹, 塩谷孝夫², 今永一成³, 井上隆司¹, 上原明¹ (¹福岡大学・医学部・生理学, ²佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理, ³福岡大学・医学部・総合医学研究センター)

脳の電位依存性Kチャネルは、KCNQ3とKCNQ2のヘテロ4量体から構成されており、神経細胞の電気的興奮を抑制している。我々はてんかん患者の過剰興奮を引き起こすKCNQ3の遺伝子変異に着目した。変異体cDNAをHEK293細胞に導入してKチャネル蛋白を発現させ、全細胞電流の性質を調べた。その結果、野生型KCNQ2及び変異型KCNQ3からなるヘテロマーチャネルを発現した細胞では、野生型KCNQ2及び野生型KCNQ3からなるチャネルよりも、電流密度が減少していた。野生型KCNQ2及び変異型KCNQ3からなるチャネルの活性化曲線は、野生型KCNQ2及び野生型KCNQ3からなるチャネルの活性化曲線よりも右側にシフトし、野生型Q2ホモマーの活性化曲線に近づいていた。次に我々はKチャネル病変変異体の立体構造の解析を行った。その結果、変異体チャネルにおいては、変異部アミノ酸とイオン選択性フィルタを構成するアミノ酸との水素結合が消失していることがわかった。この分子間結合の変化による立体構造の変化が、KCNQ3電流減少の原因であることが示唆された。

9. ラット脊髄後角における痛覚情報伝達に及ぼすトラマドールの作用

古賀亜希子, 藤田亜美, 柳 涛, 中塚映政, 熊本栄一 (佐賀大学・医学部・生体構造機能学講座・神経生理学)

塩酸トラマドールは近年臨床において多く使用されてい

る非麻薬性鎮痛薬である。行動実験や結合実験などにより、その作用機序として、 μ オピオイド受容体 (MOR) 活性化やモノアミン作用増強などが報告されているが、その詳細は不明である。今回、トラマドールの鎮痛作用機序を検討するために、皮膚末梢からの痛覚情報伝達の制御に重要である脊髄後角II層の膠様質細胞にホールセル膜電位固定法を適用し、トラマドールの第一代謝産物M1の灌流投与により誘起される膜電流の性質を調べた。M1 (1mM) は、調べた細胞の約41%において、 -70mV で外向き膜電流 (平均振幅: 約15pA) を誘起した。同じ細胞でM1 (1mM) とMOR作動薬DAMGO (1 μM) により誘起される膜電流を調べた所、両者の振幅は強い相関を示した。DAMGO (1 μM) 電流との相対比として得られたM1電流の EC_{50} 値は0.3mMであった。M1電流の振幅はMOR阻害薬CTAP (1 μM) により減少される一方、 $\alpha 2$ 受容体阻害薬ヨヒンビン (4 μM) は影響しなかった。様々な細胞外 K^+ 濃度でM1電流の逆転電位を求めた所、いずれも K^+ の平衡電位に近似した。以上より、M1は脊髄膠様質細胞においてMORを活性化し K^+ チャネルを開口することにより膜を過分極して興奮性を抑制することがわかった。これがトラマドールの鎮痛作用機序であることが示唆される。

10. GABA作動性神経終末部でのKvチャネルサブタイプの同定

島田秀樹, 歌 大介, 吉村 恵 (九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

電位依存性 K^+ チャネル (Kvチャネル) は、静止膜電位への関与や、更には活動電位の頻度と持続時間の調節も行っている。またシナプス前終末部においては、神経伝達物質の放出に対して重要な役割を果たしているが、黒質網様部におけるその役割については、未だ充分には解明されていない。これまでの報告では、黒質網様部領域 (SNr) におけるKvチャネルについて、免疫組織化学法によりKv1.1~Kv1.6の存在が示され、中でもKv1.4の強発現が報告されている。また、SNrへのGABA入力 of 投射起始核である線条体においては、Kv1.3の強い発現が見られる。そこで我々は今回、SNrから機械的に急性単離したニューロンにホールセルパッチ記録法を適用し、様々な K^+ チャネルブロッカーを用いることで、いかなるKvチャネルサブタイプが、SNrに入力する神経終末部においてGABAの放出を調整しているかを検討した。その結果、Kv1ファミリーの中で、特にKv1.2がGABA放出に深く関与していることが明らかとなった。

11. ベンゾジアゼピン受容体作動薬は $\omega 2$ 受容体を介して神経幹細胞の自己複製能を抑制する

守屋孝洋, 平石敬三, 堀江信貴, 篠原一之 (長崎大学大学院・医歯薬・神経機能学)

GABA受容体サブユニットであるベンゾジアゼピン (BZ) 受容体は $\omega 1$ 型と $\omega 2$ 型に分類され、このサブタイプに対する選択性が睡眠薬を開発する上で重要である。一方、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞はヒト成人の脳内にも存在し、脳機能において重要な役割をしていることが明らかになってきた。しかし、BZ受容体作動薬の神経幹細胞に対する効果は報告されていない。我々是非選択的作動薬のトリアゾラム、プロチゾラム、ジアゼパムおよび $\omega 1$ 型選択的作動薬ゾルピデムの神経幹細胞の自己複製能に対する効果を、*in vitro*及び*in vivo*にて検討した。

培養神経幹細胞は、サブユニット $\alpha 1, 2, \beta 2, 3$ を発現しており、 $\omega 2$ 型のBZ受容体のみを発現していることが観察された。また、非選択的BZ受容体作動薬は濃度依存的に自己複製能を抑制したが、ゾルピデムは影響を与えなかった。さらに、非選択的BZ受容体作動薬は成体マウスの側脳室下帯の神経幹細胞の自己複製能を用量依存的に抑制したが、ゾルピデムは影響を与えなかった。

以上より、神経幹細胞は $\omega 2$ 型BZ受容体を発現しており、 $\omega 2$ 型BZ受容体作動薬によって増殖能が劇的に抑制されることが明らかとなった。神経幹細胞は神経再生に重要な役割を果たしているため、脳変性疾患やうつ病等によって出現する睡眠障害の治療には、選択的 $\omega 1$ 型BZ受容体作動薬が効果的である可能性が示唆された。

12. Adrenomedullinとadrenomedullin 2の神経内分泌系および自律神経系への作用の比較

橋本弘史¹, 兵藤 晋², 川崎 展¹, 米良貴嗣¹, 陳磊¹, 征矢敦至¹, 柴田美雅¹, 斎藤 健¹, 藤原広明¹, 樋口隆³, 竹井祥郎², 上田陽一¹ (¹産業医科大学・第一生理学, ²東京大学海洋研究所・海洋生命科学部門・生理学分野, ³福井大学・医学部・統合生理学)

Adrenomedullin (AM) のスーパーファミリーとして2004年に同定されたadrenomedullin 2 (AM2) はAMと同様に、末梢投与により降圧作用や利尿作用、摂食抑制作用を示し、中枢投与により血圧・心拍増加、摂食・飲水抑制作用を示す。我々は、ラット脳室内に投与したAMおよびAM2が視床下部神経分泌ニューロンを興奮させ、下垂体後葉ホルモンのうち特にオキシトシン分泌を強力に惹起することをこれまでに報告した。そこで今回、AMおよびAM2をラット脳室内に投与し、血中下垂体後葉ホルモン濃度および平均動脈圧・心拍数への作用を検討したとこ

ろ、AM2はAMより強い作用を持つことが明らかとなった。さらに、AMおよびAM2の脳室内投与前にCGRPおよびAM receptor antagonistを投与し、視索上核および室傍核の神経分泌ニューロンの神経活動をc-fos mRNAの変化を指標として定量化した。その結果、AMの神経分泌ニューロンへの作用は完全に抑制されたが、AM2の作用は完全には抑制されなかった。以上より、AM2にはCGRPおよびAM receptor以外のreceptorが存在する可能性がある。

13. 片側舌味刺激による第一次味覚領野賦活のlaterality

脇田真仁¹、小川 尚^{1,2}、長谷川佳代子¹、小早川 達³、坂井信之⁴、肥合康弘⁵、山下康行⁶、齊藤幸子^{3,7} (¹熊本大学・院・知覚生理、²熊本機能病院、³産総研・人間福祉工、⁴神戸松蔭短大・生活科学・生活心理、⁵熊本大学・医学部・保健、⁶熊本大学・医・病院・中央放射線、⁷齊藤幸子味覚臭覚研究所)

我々はこれまでMEGとfMRIにより、ヒトの第一次味覚領野を頭頂弁蓋部と島上後部 (areaG)、ならびに中心溝下端とローランド弁蓋部に見出した。サルでは味覚伝達経路が同側性であることがわかっているが、ヒトでは対側性、両側性などの報告があり、味覚伝達経路の側性は不明である。そこで今回、ヒトの第一次味覚領野への投射のlateralityを調べるために一側の舌前領域に味刺激を与えfMRIにより大脳皮質味覚領野の賦活を解析した。

健康成人12名(男4名女8名、右利き)が参加し、コンピュータ制御の味刺激装置を用いて、被験者の舌の右側あるいは左側前方部に限局的にパルス状の味刺激(1M NaCl)を与えた。MRスキャナーMagnetom Vision (Siemens) 1.5Tを用いて撮像し、SPM99により画像解析を行った。その結果、個人解析では右側刺激で両側もしくは同側のareaGに、左側刺激で殆ど両側のareaGに賦活が検出され、対側のみの賦活は検出されなかった($P < 0.05$ FDR corrected, entire volume)。グループ解析では、舌右側および左側刺激で両側のareaGに賦活がみられ、さらに舌左側刺激で両側のcsに同側のRopに賦活が検出された($P < 0.05$ FEW corrected, ROI analysis)。対側の賦活は脳梁経由の可能性もあるので、今後詳しい解析が必要である。

14. 寒冷血管拡張反応からみた局所耐寒性に関する研究

樋口健吾¹、松波 勝¹、田井村明博²、土屋勝彦² (¹長崎大学大学院・生産科学研究科、²長崎大学・環境科学部・自然環境保全講座)

本研究では手の中指を5℃の冷水に浸漬させ、最初の寒冷血管拡張反応 (CIVD) 開始からの反応パターンに着目し、その特性を検討することを目的とした。被験者は健康な男子学生24名(21.4 ± 2.1歳)を対象とした。実験は27℃、50%の人工気象室で行い、30分間の指先浸漬の前後に15分間の安静をとり、皮膚温や温度感覚などの測定を計60分間行った。冷水浸漬開始後、最初のCIVD以降の平均指皮膚温 (MST) とその反応変動係数 (CV) から4つのグループ (G1, G2, G3, G4) に分類された。そこで、グループ別に寒冷刺激に対する反応の特徴を検討した結果、G1はMSTが高くCVが小さいこと、寒冷刺激に対する反応・回復が速く、快適性の幅も広いことから、寒冷刺激に対する調節能が優れていると考えられる。またG4は、CVがG1と同様に小さく、MSTが低いこと、またその反応・回復が遅く、快適性の幅が狭いことから、G1と比較してG4の動静脈吻合の働きの鈍化していると推察された。最初のCIVD以降から浸漬終了までのMSTとCVによって、寒冷刺激に対する調節能の評価が可能となることが示唆された。

15. ラットの後根神経節細胞を用いた、種々の局所麻酔薬の活動電位抑制効果の比較

歌 大介、古江秀昌、古賀浩平、久光涼子、島田秀樹、吉村 恵 (九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

過去の研究において、S (-) bupivacaineはR (+) bupivacaineに比べ心臓及び中枢神経系に及ぼす毒性が低い事が示されている。そこで今回我々は、SDラットの後根神経節 (DRG) 標本を用いて、細胞内記録によって、levobupivacaineとして知られているS (-) bupivacaine、R (+) bupivacaine、ラセミック bupivacaine及びropivacaineを灌流投与し、DRGから記録された活動電位に対するこれらの局所麻酔薬の抑制効力の比較を行った。DRGは閾値や伝導速度を基に、無髄のC線維を持つ細胞、細い有髄のA δ 線維を持つ細胞及び太い有髄のA β 線維を持つ細胞に分類し、記録された活動電位と局所麻酔薬の抑制効果を解析した。その結果、ラセミック bupivacaineとR (+) bupivacaineのIC50はA β 、A δ 及びC細胞でほとんど変わらない値であった。しかしながら、levobupivacaine及びropivacaineのIC50は、A δ 及びC細胞はA β 細胞と比較し低い値となった。この結果から、levobupivacaineは他の局所麻酔薬に比べ選択的に細い求心性線維を抑制する事が明らかとなった。

16. 幼若ラット脊髄における前角ニューロンの発火パターンとその膜特性

久光涼子, 歌 大介, 島田秀樹, 古江秀昌, 吉村 恵
(九州大学大学院・医学研究院・統合生理学)

歩行運動などの律動的な運動における基本的な運動パターンは, 脊髄運動中枢に存在するネットワーク(中枢パターン発生: CPGs)によって生成される。これまでに, 上位からの入力がない状態で筋活動のパターンを生み出すのに十分なCPGsが脊髄内に存在し, 歩行運動だけでなく様々な運動パターンを生成する可能性あることが報告されている。しかしながら, 既知のCPGsの機能は, 比較的単純な神経ネットワークを持つ脊椎動物を用いた研究から得られたものが主であり, より複雑な神経ネットワークを持つ哺乳動物ではほとんど知られていない。また, 哺乳動物での研究は, 主に新生ラット, マウスの摘出標本を用いており, スライス標本を用いた研究は少ない。

そこで, 我々は, ラットの脊髄スライス標本を用いて前角ニューロンの電気生理学的な特性を調べた。current-clamp条件下でのニューロンの活動を調べたところ, ほとんどのニューロン(Silent type)は特異的な活動を示さなかったが, 一部のニューロン(Burst type)では律動的な発火パターンを示した。voltage-clamp条件下においては, 両タイプのニューロンともに律動的なシナプス入力は見られなかった。このような律動的な発火を示すニューロンは, おそらくCPGを形成するニューロンの一部であり, 歩行運動などのlocomotionにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。

17. 成熟ラット脊髄後角のホスホリパーゼA₂活性化による興奮性シナプス伝達の促進

岳 海源, 藤田亜美, 柳 涛, 古賀亜希子, 中塚映政, 熊本栄一(佐賀大学・医学部・生体構造機能学講座(神経生理学分野))

脊髄後角の痛み伝達におけるホスホリパーゼA₂(PLA₂)の役割を知るために, PLA₂を活性化することが知られているメリチンが, 皮膚末梢から脊髄に入力する痛み情報の制御に重要な役割を果たす後角第II層(膠様質)における興奮性のシナプス伝達にどんな作用を及ぼすかを調べた。実験は, 成熟ラットから脊髄横断スライス標本作製し, 膠様質ニューロンに通常のプラインド・ホールセル膜電位固定法を適用することにより行った。メリチンは濃度依存性に自発性興奮シナプス後電流(sEPSC)の発生頻度を増加させ, そのEC₅₀値は1.1 μMであった。この作用はPLA₂阻害剤(4-bromophenacryl bromide, 10 μM), 細胞外Ca²⁺除去, Ca²⁺チャネル阻害剤La³⁺(30 μM)により抑制される一方, アラキドン酸(AA)代謝阻害剤であるindomethacin(100 μM)やnordihydroguaiaretic acid

(100 μM)により影響を受けなかった。メリチンによるものと同様なsEPSCの発生頻度増加はAA(50 μM)によってもみられた。以上より, 脊髄後角のPLA₂活性化により生成されるAAは, その代謝経路を介さずに神経終末の膜電位依存性Ca²⁺チャネルを通して細胞外から流入するCa²⁺量を増加させることによりグルタミン酸放出を促進すると示唆される。

18. 肺癌脳転移におけるミクログリア, アストロサイトの役割

清家稔博¹, 藤田慶大¹, 城戸瑞穂², 田中輝男², 井口東郎³, 野田百美¹(¹九州大学薬学研究院病態生理学分野, ²九州大学歯学研究院硬組織構造解析学分野, ³九州がんセンター)

癌治療法の進歩により腫瘍原発巣の制御はある程度までは可能となったが, 転移の制御はいまだ満足できる状況ではなく, 癌患者死亡の最大の原因となっている。今後原発巣の治療法の向上に伴い, 脳転移は増加すると考えられるが, その研究は立ち遅れている。脳転移では血液脳関門が癌により破壊されない限り, 化学療法が困難であり, 放射線療法も再発や組織損傷の問題が伴う。脳転移の機構を解明することは重要であると考え, 今回我々は転移の過程においてミクログリアとアストロサイトがどのような働きをしているのかを検討した。HARA-B細胞(ヒト肺扁平上皮癌細胞)をヌードマウスの心腔内に接種後, 脳での免疫染色を行ったところ, HARA-B細胞周辺で活性化ミクログリアの凝集および活性化アストロサイトの凝集がみられた。またin vitro系にてHARA-B細胞の増殖はミクログリアとの共培養あるいはミクログリア培養上清添加により抑制された。一方, アストロサイトとの共培養では増殖は促進された。以上のことより, ミクログリアとアストロサイトは脳転移した肺癌細胞の増殖に対して相反する作用を示すことが示唆された。

19. 1-Bromopropaneは内分泌攪乱物質か?

成清公弥¹, 粟生修司¹, 笛田由紀子², 市原有美¹, 松浦弘典¹, 石田尾 徹³, 保利 一³, 福永浩司⁴(¹九州工業大学大学院生命体工学脳情報専攻高次脳機能講座, ²産業医科大学産業保健学部第1生体情報学, ³第1環境管理学, ⁴東北大学大学院薬学研究科薬理学分野)

1-プロモプロパン(以下1-BP)は産業界で洗浄溶剤等に使われているフロン代替化合物である。近年この1-BPが生殖器や成熟脳へ影響することが報告されている。本研究では妊娠ラットに1-BP(700ppm)をday1からday20までの20日間, 1日6時間の吸入曝露を行った後, 生まれた

仔の成熟後（6-8週齢）の行動の性分化および海馬の電気生理学的特性を調べた。1-BP曝露群の仔の生後発達は、体重増加が対照群と比べてわずかに抑制されることを除いて有意な差はなかった。行動評価試験においては、オープンフィールド試験における探索行動および強制水泳試験における不動時間の行動の性差が消失し、行動の性分化への障害が認められた。また海馬の電気生理学的特性の評価では、曝露群の海馬CA1領域で興奮性に変化が認められた。1-BPの胎児期曝露が成長後のラットの海馬においても影響を残していることから、1BPは脳に不可逆的な変化を起こしていると考えられる。また成熟後の行動の性分化に障害が認められたことより、1-BPは内分泌攪乱物質として脳に作用している可能性がある。

20. 視覚的カテゴリー弁別課題遂行中のサル前頭眼窩皮質におけるニューロン活動

井上貴雄, Balazs Lukats, 坂井健二, 佐々木重由美, 高良沙幸, 水野雅晴, 粟生修司（九工大院生命体工学研究科脳情報専攻高次脳機能）

食物の探索や性の識別は食物摂取やパートナー選択といった動物の生存にとって重要な機能であり、それらの選択機構は食欲や性欲といった本能と、対象の物体をある特定のグループ（カテゴリー）として識別する高次認知機能から成り立っている。今回、そのカテゴリー認知機構を調べる目的でアカゲザルに視覚的カテゴリー弁別課題を学習させた。食物対非食物もしくは雄ザル対雌ザルといった対立関係にある視覚情報を呈示し、呈示画像がどちらのカテゴリーに属しているかをレバー押しによって判定させた。この課題遂行中に、食物の認知に関連した扁桃体からの強い入力を受けている前頭眼窩皮質（OBF）から神経活動を記録した。従来OBFで報告されている報酬関連応答や感覚応答の他に食物、非食物、雄ザル、雌ザルのそれぞれのカテゴリーや食物・非食物、サルといった大域的なカテゴリーに選択的な応答が見出された。中でも、食物関連カテゴリーに選択的に応答するニューロンが最も多く、サル関連カテゴリーに対する応答と比較すると反応の潜時は短く発火頻度の強度も高かった。以上の結果より、前頭眼窩皮質は“動物の生存にとって重要なカテゴリー弁別”の処理を行っていることが示唆される。

21. コイの遊泳活動の夜行性と昼行性の概日リズムについて

土屋勝彦¹, 一瀬千重², 松永知恵², 田井村明博¹（¹長崎大学・環境科学部・自然環境保全講座, ²長崎大学大学院・生産科学研究科）

実験室内の水槽で体長約30cmのコイを飼育し、その腹腔にテレメーター発信器（DSI社）を慢性的に装着して遊泳活動量を連続記録した。照明には蛍光灯を使用し、12/12時間の明暗サイクルとし、水温は22℃～24℃に調節した。コイは各々、個別の水槽で飼育され互いの個体が見えないように配置された。コイの遊泳活動について、夜行性（暗期に活動量増加）及び昼行性（明期に活動量増加）のリズムが観察された。両者のリズムは恒明又は恒暗条件下で2～3日残存し、位相が後退することが多かった。従ってこれらの遊泳活動のリズムは内因性の概日リズムで、その周期は24時間より長いと考えられる。約1ヶ月間の記録観察中、間欠的にまたは終始夜行性の活動リズムを示す個体もあったが、昼行性と夜行性の活動リズム間で相互に移行する個体もあった。昼行性と夜行性の活動リズム間で相互に移行する場合、突然に変化するのではなく、活動リズムの位相が次第にシフトした。コイの遊泳活動の夜行性及び昼行性リズムの成因についてはなお十分に明らかでない。

22. 酸性線維芽細胞増殖因子は迷走神経内臓求心性入力を介し発熱する

松本逸郎¹, 土屋勝彦², 嶋田敏生¹, 相川忠臣¹（¹長崎大学・医学部第一生理, ²環境科学部環境保全講座）

酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）は摂食や糖負荷により脳内で上昇し摂食を抑制する。aFGFは脳室内投与でも静脈内投与でも肩胛骨間褐色脂肪組織や副腎を支配する交感神経を賦活する。ウイスター系ラットに静脈経由でaFGF（100ng/kg）を投与し、無麻酔・無拘束下にテレメーターシステムで体温を記録すると腹腔内体温は約1.5度C上昇した。このaFGF誘発の体温上昇は迷走神経の肝・門脈枝の切除で有意に減弱し、肝・門脈枝と胃枝を併せて切除すると完全に消失した。ウレタン・クロラロース麻酔下でも静脈内投与のaFGFは6時間以上にわたって結腸温の上昇を起こした。尾部温は3相性の反応曲線を示した。まず結腸温が急上昇中は低下し続け、プラトー期に達すると上昇に転じ第一のピークに達した。その後結腸温がさらに上昇すると再度低下し始め、プラトー期に達すると上昇に転じ第二のピークに達した。メチルプレドニゾロン30mg/kgの腹腔内投与はaFGFによる発熱を有意に減弱した。aFGFによる発熱反応はLPSによく似た炎症・発熱応答を示し、消化管領域での炎症に対して何らかの防衛的役割を果たすと考えられる。

23. Regulation of uPA mRNA by c-phycoerythrin through cAMP mediated PKA pathway in human fibroblast WI-38 cell line

Harishkumar, M*, Radha, K.S., Nakajima, Y., Omura, S., and Maruyama, M (*Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

C-phycoerythrin (c-pe) is a 47 kD a blue coloured fluorescent protein, purified from blue green algae, *Spirulina fusiformis*. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) is a key enzyme in plasminogen system, playing a governing role in various pathophysiological events. In experiments reported here, we have investigated the mechanism of action of c-pe induced uPA gene regulation in human fibroblast (WI-38) cell line. uPA antigen levels increased in a dose-dependent manner. Treatment of cells with c-pe significantly enhanced uPA mRNA levels. Time course study (up to 8 hrs) of uPA degradation in the presence of DRB, a transcriptional inhibitor, showed no significant difference between c-pe stimulated and non stimulated cells, implying that regulation is at the transcriptional level. Furthermore, co-treatment of c-pe with cycloheximide (200 μ g/ml) resulted in over-accumulation of uPA mRNA suggesting that c-pe induced uPA regulation does not require de novo protein synthesis. The present investigation also provided an insight into the regulatory pathway of uPA expression. Experiments with DDA and dbcAMP showed that the action of c-pe is cAMP dependent. Separate experiments with PMA (PKC stimulator) and KT-5200 (PKA inhibitor) confirmed that c-pe activates uPA mRNA through PKA pathway.

24. ラット小腸における麦芽糖の消化・吸収機構の温度依存性

清末達人, 宮元さやか, 森廣暁子, 矢野晶子 (西南女学院大学・保健福祉学部・栄養学科)

〔目的〕小腸刷子縁における麦芽糖消化に対する体温の影響を明らかにするため, 麦芽糖のブドウ糖への消化過程とブドウ糖吸収過程とに分けて, それぞれの温度依存性を検討する。〔方法〕麻酔下にラット小腸を摘出, 反転小腸囊標本を作成した。200mg/dlのブドウ糖または麦芽糖を含むタイロッド液を粘膜側に, 糖を含まないタイロッド液を漿膜側に入れ, 11~46℃にて50分間インキュベートし, 前後のブドウ糖濃度をHexokinase/Glucose-6 phosphate dehydrogenase法にて測定した。麦芽糖消化過程は, phloridzin (1mM) を用いてNa⁺依存性ブドウ糖輸送体

(SGLT1) を阻害した条件で実験を行った。〔結果〕ブドウ糖の吸収は低温および高温下で著しく抑制された。Arrhenius Plotから, ブドウ糖の吸収過程には, 加温により活性化される成分と不活性化される成分があることが判明した。一方, 麦芽糖消化過程は鈍な温度依存性を示し, 46℃においても36℃に比べて増加傾向を示した。麦芽糖消化のArrhenius Plotから, 加温により促進される単一成分の存在が示唆された。〔考察〕麦芽糖消化過程とブドウ糖吸収過程の温度依存性の違いにより, 麦芽糖負荷時に, 低温ならびに高温下で管腔内にブドウ糖が蓄積した。これは, 低体温あるいは高体温時に浸透圧性下痢を誘発する機序の一つである可能性がある。

25. 家兎血小板内蛋白のチロシンリン酸化に及ぼすハプトビンの影響

天願博敦, 高良 秀, 吉岡美和, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一)

〔目的〕ハプト由来トロポニン様酵素 (ハプトビン) は, 家兎洗浄血小板のCollagen凝集を抑制し, 血小板膜蛋白の β_3 に結合するのをこれまでに報告している。本研究は, ハプトビンの血小板凝集抑制機序にチロシンリン酸化の抑制が関与しているかと予想し, 血小板チロシンキナーゼに及ぼすハプトビンの影響を追究した。〔方法〕家兎洗浄血小板 (WP) は, 渡辺らの方法を一部改変し作製した。WPのCollagen凝集を確認後, 血小板内蛋白のチロシンリン酸化は抗リン酸化チロシン抗体 (4G10) を用いたWestern Blotting法で確認した。ハプトビン添加後のCollagen凝集のチロシンリン酸化の確認も同様に行い, 比較検討した。〔結果〕WPのCollagen凝集では, 凝集初期から時間経過と共に血小板内蛋白のリン酸化の増強がみられた。すなわち, Collagen凝集初期に, 55, 60, 72, 116kDの蛋白にリン酸化がみられた。一方, ハプトビン添加WPでは, Collagen凝集初期にチロシンリン酸化はみられずに, 凝集3分後に60, 72, 116kDの蛋白にリン酸化がみられた。FAKの免疫沈降法では, ハプトビン添加WPのチロシンリン酸化はみられなかった。〔考察〕ハプトビンが, インテグリン β_3 に結合するとFAKの構造が変化し, チロシンリン酸化が遅延して $\alpha_{IIb}\beta_3$ のinside-outシグナルが遅くなり, Collagen凝集が抑制されると推察された。

26. Bound thrombinはラット内皮細胞のトロポニン受容体と結合する

高良 秀, 天願博敦, 吉岡美和, 中村真理子, 小杉忠誠 (琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

〔目的〕フィブリンの機械的破砕により生じたクロット

形成後トロンビン (Bound thrombin ; B-th) は、内皮細胞を透過する。また、B-th は平滑筋細胞の形質変換を引起すのをこれまでに報告した。しかしながら、B-th の内皮細胞透過機序は未だ明らかでない。そこで、B-th の内皮細胞透過の第一段階を内皮細胞膜上の受容体との結合にあると予測し、ラット大動脈由来内皮細胞 (RAEC) とトロンビン受容体 (TR) の抗体 (ATAP2) を用いて、B-th の TR との結合について形態学的手法により検討した。【方法】培養した RAEC を ATAP2 抗体と TRITC 標識抗体で免疫蛍光染色し、RAEC 膜上の TR の存在を確認した。次いで、RAEC に B-th および Native thrombin (N-th) を反応させ RAEC 膜上の TR の形態的に量的変化を経時的に観察した。【結果】培養 RAEC 膜上に ATAP2 抗体と反応する TR の存在が確認された。B-th および N-th 添加後、反応時間に依存して ATAP2 抗体と反応する RAEC 膜上の TR が減少した。N-th のそれと比較して、B-th 添加後の RAEC 膜上では TR の残存がみられた。【考察】B-th も N-th と同様に内皮細胞膜上の TR と結合し、TR の N 末端を限定分解するのが観察された。B-th が TR に結合した後に、細胞内へのシグナル伝達を介して、細胞収縮を引き起こし細胞間の接着分子が引き離される。その結果、細胞間隙が拡大し、B-th は内皮細胞層を透過するものと推察した。

27. 受容体作動性 Ca^{2+} 透過型陽イオンチャンネル TRPC6 のミオシン軽鎖キナーゼ阻害薬 ML9 による直接抑制

高橋眞一¹、史 娟²、梅林ちさと¹、井上隆司¹ (福岡大学医学部生理学、²第四軍医大解剖学)

血管の受容体作動性 Ca^{2+} チャンネルの有力な候補分子である TRPC6 蛋白質の活性化過程に、 Ca^{2+}/CaM 依存性リン酸化酵素の一つであるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) が関与しているか否かについて、幾つかの阻害薬の効果を調べた。マウス TRPC6 蛋白質を発現した HEK293 細胞を電位固定カルバコール (100 μ M) を投与すると、 Ca^{2+} 透過性陽イオンチャンネル電流 (I_{TRPC6}) が活性化された。 I_{TRPC6} の振幅は MLCK 阻害薬 ML9 の細胞外添加によって濃度依存的に抑制された ($IC_{50} = 7.76 \pm 2.60 \mu$ M)。この抑制は迅速且つ可逆的に起こり、細胞外陽イオンを N-methyl D-glucamine で置換した場合とほぼ同等の時間経過を示した。TRPC7 を発現した HEK293 細胞で同様の実験を行った場合は速やかな増強効果のみが見られた。ML9 と構造的に異なる MLCK 阻害薬 wortmannin (3 μ M) を前処置した場合や MLCK の選択的ペプチドを細胞内に投与した場合には、 I_{TRPC6} や I_{TRPC7} に対する有意な効果を認めなかった。 I_{TRPC6} に対する ML9 の効果は電位依存的で、過分極電位側

ほど抑制の程度が顕著であった。以上の結果から ML9 は、MLCK の抑制とは無関係の機序、恐らく TRPC6、TRPC7 チャンネルのイオン透過孔付近に対する直接作用によって、これらのチャンネル活性を修飾する可能性が強く示唆された。

28. ラット脳弓下器官神経細胞における I_A 電流の Kv チャンネルサブタイプ

小野堅太郎¹、豊野 孝²、本田栄子¹、稲永清敏¹ (九州歯科大学・生命科学講座・生理学分野、²九州歯科大学・生命科学講座・口腔組織機能解析学分野)

飲水行動や循環調節に関与する脳弓下器官は、血液脳関門が欠如しているため血行性のペプチドホルモンの直接作用を受ける特殊な中枢神経核である。この神経細胞はアンギオテンシン II によって外向き一過性カリウム電流 (I_A) が抑制されることで神経興奮性を高めるといことが多くの論文で示されている。近年、 I_A を形成する電位依存性カリウムチャンネル (Kv) 分子が同定されてきたが、この脳弓下器官神経細胞における I_A の Kv チャンネルサブタイプについては全く検討されていない。そこで、電気生理学的・薬理的・分子生物学的手法を用いて、ラット脳弓下器官の単離神経細胞を用いて検討を行った。Kv3.4 の特異的抑制剤 BDS-I により、およそ半数の脳弓下器官神経細胞において振幅の小さな I_A が存在していた。一方、電気生理学的に Kv4 によると思われる I_A はすべての神経細胞で確認され、振幅も大きかった。細胞外への Cd^{2+} によってこの I_A の電位依存性がシフトしており、single-cell RT-PCR によりすべての神経細胞に Kv4.2 が検出されたことから、脳弓下器官神経細胞における I_A の主要な成分は Kv4.2 である可能性が示唆された。さらに、この I_A 成分はアンギオテンシン II の 30nM 投与後に抑制された。以上の結果より、脳弓下器官神経細胞における I_A 電流の Kv チャンネルサブタイプは Kv4.2 が主要であり、アンギオテンシン II はこのチャンネルに作用することが示唆された。

29. 味覚閾値と食事摂取量の関係 —化学療法の血液がん患者での検討—

木村安貴¹、砂川昌範²、中村真理子²、砂川洋子¹、小杉忠誠² (琉球大学大学院・保健学研究科・成人看護学講座、²琉球大学・医学科・形態機能医学講座・生理学第一分野)

【目的】化学療法の副作用の中で、味覚変化が高頻度で生じるのが知られている。味覚閾値と食事摂取量との関連を明らかにするために、化学療法経過に伴う味覚閾値の経時的変化および食事摂取量の測定を行った。【対象と方法】

沖縄県内2施設で化学療法を受けている血液がん入院患者で、研究主旨を説明し同意の得られた21名を対象とした。味覚検査、食事摂取量測定および質問紙アンケート調査を、治療前、治療3日目、治療1週目、治療後2週目の計4回実施した。味覚検査は三和科学製の調整済4味質5段階濃度の味質液0.05mlを、被験者舌上の鼓索神経領域に滴下した。識別できた最低濃度を被験者の味覚閾値とした。【結果】化学療法治療経過に伴う味覚変化を自覚した患者数は、治療3日目に増加し、その後減少する傾向がみられた。治療経過に伴う4味質平均味覚閾値の経時的変化に有意差はみられなかったが、治療3日目に上昇傾向がみられた。食事摂取率は治療3日目に有意に減少した。甘味と酸味の味覚閾値と食事摂取率との間に有意な相関がみられた($p < 0.05$)。食事摂取率を目的変数、味覚閾値を説明変数とする重回帰分析の結果、甘味と酸味の標準偏回帰係数が0.44及び-0.25であり、有意に影響するのが判明した。【結論】化学療法に伴う味覚閾値変化により食事摂取量が変化する傾向がみられた。甘味と酸味の閾値が食事摂取量に影響するのが判明した。

30. ヒト甘味感受性と遺伝子多型性についての解析

重村憲徳, アブA.S.イسلام, 中村由紀, 城崎慎也, ニノ宮裕三 (九大院・歯・口腔機能解析学)

近年、分子遺伝学的研究の進展により、味覚受容体が次々とクローニングされ、その機能解析がなされている。その中で、甘味受容体に関してはT1r2/T1r3複合体が唯一の受容体であるとするものと、受容体はその他にもあり複数個存在するものとの主張が分かれている。そこで本研究では、ヒトの甘味受容体はいくつ存在しているのかについて調べた。方法は、健康成人58名における10種の異なる甘味物質(天然糖、人工甘味料、アミノ酸)の味覚閾値を全口腔刺激法により測定し、個体、味物質間の相関を検索した。また甘味抑制物質であるギムネマ酸とその効果の消去物質である γ -シクロデキストリンの修飾効果についても解析を行った。その結果、10種類の甘味物質の味覚閾値は3群(D-Phe, D-Trp, その他)に分類された。またL-Proについてはnon-tasterが多くみられた。ギムネマ酸の効果は、天然糖、人工甘味料+Gly, D-Phe+D-Trp, L-Proとの間に差がみられた。以上の結果より、甘味受容サイトは少なくとも5つ存在している可能性が示唆された。現在、T1r2/T1r3の遺伝子多型とこの味覚感受性の多様性との相関について解析を行っている。

31. 末梢における味覚情報の伝達様式の解析

吉田竜介, 重村憲徳, 安松啓子, ニノ宮裕三 (九大院・

歯・口腔機能解析学)

マウス茸状乳頭の活動電位を発生する味細胞と鼓索神経の単一神経線維の応答を調べ、これらの応答性を比較し、味細胞から味神経への味覚情報の伝達様式を検討した。味細胞の味刺激(NaCl, サッカリン, HCl, キニーネ)に対する応答を調べたところ、幾つかの味細胞では味孔側から与えた味刺激により活動電位頻度が増大した。応答した味細胞の約60%は4種のうち1種の刺激に反応し、4種の刺激に対する応答性の広がりを示すエントロピー値は 0.207 ± 0.253 で、この値は鼓索神経のエントロピー値(0.216 ± 0.272)に近似した。クラスター分析により、味細胞も味神経線維も共に大きく4つのグループ(NaCl, サッカリン, HCl, キニーネ)に分類された。さらに、最も強く応答する刺激により味細胞と味神経を分類し、その割合を細胞-神経間で比較すると有意差がなかった。これらの結果により、活動電位を発生する味細胞から味神経へは味覚情報が大きな調節なしに伝達されている可能性が示唆された。

32. 脂肪酸による苦味抑制効果の精神物理学的、分子遺伝学的、神経行動学的解析

安松啓子¹, 斉藤幸子², Ding Ming³, 村田裕子⁴, Robert F. Margolskee³, ニノ宮裕三¹ (¹九大院・歯・口腔機能, ²斉藤幸子味覚嗅覚研究所, ³Dept. of Physiol. & Biophys., Mount Sinai Sch. Med., ⁴中央水産研究所)

ラットは、不飽和脂肪酸を水より好む。これは脂肪酸がチャネルやトランスポーターを介して味細胞を刺激することによっておこる味情報に基づいていると推定されている。不飽和脂肪酸による味の修飾効果を検討するため、ヒト味覚官能テスト、マウス鼓索・舌咽神経応答、行動応答の解析を行った。その結果DHAの苦味選択的抑制効果が明確に認められ、その効果はDHA > リノール酸 > EPA, オレイン酸の順であった。また、マウス鼓索・舌咽神経応答の結果から、苦味を呈するアミノ酸への抑制効果は見られなかった。ウシ有郭乳頭味蕾を用いたトリプシンアッセイ、ガストジューシンKOマウスの味神経応答の解析により、DHAはガストジューシンを介する経路を特異的に抑制し、それはガストジューシンに対する直接の抑制ではないことが示された。以上の結果より、不飽和脂肪酸によって食品中の苦味が抑制され、その食品がより好ましい味に感じられる可能性が示唆され、その苦味抑制は、T2R受容体およびGタンパクガストジューシンを発現する味細胞の受容体の活性化を抑制することによることが示唆された。

33. 破骨細胞に発現するCl⁻チャンネルはオルガネラ酸性化を促し骨吸収に寄与する

岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 李 京平, 中尾彰宏, 岡部幸司 (福岡歯科大学・細胞分子生物学・細胞生理)

破骨細胞 (OC) に発現するCl⁻チャンネルCIC-7は, OCの波状縁に発現し, 骨吸収に必須なH⁺分泌を支える機能分子である。一方, OCからホールセルパッチクランプ法により誘導したCl⁻電流の性質は報告されているCIC-3の性質に類似していた。そこで, 今回はマウス骨髄から誘導したOCを用いて骨吸収におけるCIC-3の役割を検討した。OCにはCIC-7のみならずCIC-3も発現していた。また, その発現部位はCIC-7と異なり波状縁以外の部位に顕著であった。CIC-3ノックアウト (KO) マウスとwild-type (WT) 由来OCのCl⁻電流を比較した結果, KOマウス由来のOCにおいてもWTと同等のCl⁻チャンネル活性が保たれていることが分かった。従って, CIC-3は細胞膜のイオンチャンネルとしてCl⁻輸送に関与している割合は低いと考えられた。次に, siRNA法によりCIC-3の発現を抑制すると細胞内のオルガネラ酸性化が減弱し, 骨吸収活性も低下した。また, CIC-3KOマウス由来OCにおいてもオルガネラ酸性化の減弱と骨吸収活性の低下が認められた。以上の結果より, CIC-3はオルガネラ膜のCl⁻チャンネルとして, 骨吸収に必須とされるendosomeやlysosomeなどの酸性化に寄与し, CIC-7とは異なる機序でOCの骨吸収機能を支えていることが明らかになった。

34. AD/HDモデルラット (SHR) と対照ラット (WKY) との脳スライス標本に含まれるcatecholamine量の比較検討

池浦佐和子, 石松 秀, 木谷有里, 赤須 崇 (久留米大学・医学部・生理学・統合自律機能)

注意欠陥/多動性障害 (AD/HD) は小児の3~7%にみられる発達障害で, 臨床上methylphenidate (MPH) が広く使用されている。MPHはシナプス終末でのnorepinephrine (NE), dopamine (DA) の取り込み阻害作用を持つことから, AD/HDの病因にNE, DAが深く関わるものと推察される。本研究では高速液体クロマトグラフにより, AD/HDモデルラット (SHR) と対照ラット (WKY) から各々青斑核 (LC), 内側前頭前野 (mPFC), 線条体 (Str) を含む脳スライス標本を作製し, ホモジネートした標本中に含まれるDA, NE量を測定し比較検討したので報告する。

NEはSHR, WKYともにLCで有意に多く, mPFC, Strでは少なかった。またDAはSHR, WKYともにStrで有意に多く, LC, mPFCで少なかった。NE含有量は

WKYに比してSHRの方がLC, mPFC共に有意に多かった。一方, DA含有量はWKYとSHRとで差はなかった。

以上の結果は, SHRではLCからのNEの放出が低下し, そのためにLCの細胞内にNEが貯留していることを示唆する。これは我々の電気生理学の実験で, LCの静止膜電位がSHRはWKYよりも浅いという結果と一致する。MPHは, NE-transporterを阻害することでシナプス間隙のNEを増加させ, NEの伝達促進するものと推察される。

35. 各種ストレスに対する血液カルシウム応答

劉 坤, 野口明子, 粟生修司 (九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻)

背臥位伸展位で雌ラットを2時間拘束すると2時間後の血中イオン化カルシウム濃度が約0.05mM低下することが知られている。しかし, そのカルシウム動態の詳細な時間経過やストレスの種類による差異はまったくわかっていない。無麻酔あるいはエーテル麻酔下で拘束処置を行い, 血液カルシウム動態の時間経過を比較検討した。さらにコミュニケーションボックスによる電気ショックストレス (1mA, 3秒/分, 10回) および電気ショック群に囲まれることによる心理ストレス時の血中カルシウム動態を調べた。無麻酔拘束ストレス下では15分後から有意にカルシウム濃度が低下し, 2時間後まで持続した。エーテル麻酔下で拘束すると低カルシウム血症は著明に減弱した。電気ショック (3秒/分, 10回) でも15分後には血液カルシウムレベルが下がり始めており, 30分後より有意に低下し, 120分まで作用が持続した。心理ストレスでは低カルシウム血症は誘発されなかった。ヒスタミンH₂受容体遮断薬ラニチジンの前処置はストレス性低カルシウム血症の発生を抑制した。以上の結果, 覚醒時の拘束や電気ショックなどの物理的ストレスは15分以内に低カルシウム血症を誘発し, その発生にヒスタミンH₂受容体が関与していることが明らかになった。

36. ラット副腎髄質における内因性GABAシステムの組織局在について

遠藤 豊, 原田景太, 井上真澄 (産業医大・医・第2生理)

GABAは副腎髄質細胞に対し興奮性の膜電位応答をきたしカテコールアミン分泌を促進することから, 生理的な分泌調節因子である可能性が示唆される。そこで副腎髄質における内因性GABAシステムの存在を検討するために, ラット副腎を用い, 免疫組織化学的手法によりグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD), 小胞型GABAトランスポーター (VGAT) および数種のGABA_A受容体サブタイプの組織

局在を調べた。GADおよびVGAT様免疫反応物は少なくとも副腎皮質（束状層，網状層）には認められず副腎髄質に認められた。またGABA_A受容体については $\alpha 1$ ， $\alpha 3$ ， β ， $\gamma 2$ サブタイプ様免疫反応物が副腎髄質に認められた。ウェスタンブロット法，RT-PCRについてもこれを支持する結果が得られた。以上より，副腎髄質には内因性GABAシステムが存在し，GABAが副腎髄質細胞で産生され，paracrineあるいはautocrineとして作用し，カテコールアミン分泌調節に関与すること，また仲介するGABA_A受容体は $\alpha 1$ ， $\alpha 3$ ， β および $\gamma 2$ を含む五量体である可能性が示唆された。

37. Expression of Na⁺/Ca²⁺ Exchangers in Mouse Osteoclasts and Their Functional Role in Bone Resorption

Jing-Ping Li¹, H. Kajiya¹, A. Nakao¹, F. Okamoto¹, T. Iwamoto² and K. Okabe¹ (¹Department of Physiological Science and Molecular Biology, Fukuoka Dental College, ²Department of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka University)

Na⁺/Ca²⁺ Exchangers (NCX) in mammalian plasma membrane form a multigene family composed of NCX1, NCX2 and NCX3. NCX acts as a bi-directional transporter that catalyzes the exchange of Na⁺ for Ca²⁺ depending on the electrochemical gradients across plasma membrane. However, the expression and functional role of NCX in mammalian osteoclast are still unknown. We examined the NCX expression by means of RT-PCR, immunoprecipitation and Western Blotting. RT-PCR suggested that NCX isoforms 1 and 3, but not 2, were expressed in mouse osteoclast. Immunoprecipitation also failed in finding NCX2. However, NCX1 and NCX3 appeared as bands of about 100 kDa. As far as splicing variants were concerned, NCX1A, 1B and 3B mRNA were found in mouse osteoclast. DNA sequencing confirmed their existence as NCX1ABD, NCX1BD and NCX3BDEF. Among them, NCX1ABD is a novel splicing variant, which we named as NCX1.41. Surprisingly, it contains both A and B exons, although they have been thought to be mutually exclusive. In the presence of ouabain, low extracellular sodium or sodium deletion could induce Ca-influx mode of NCX in osteoclast, resulting in an elevation of intracellular calcium. This elevation could be completely abolished by removing extracellular calcium, or partially suppressed by NCX selective inhibitor SN-6 or KB-R7943. NCX 1 heterozygous osteoclasts showed similar responses like wild

type osteoclast, except that their sodium-dependant calcium influx was much smaller. Finally, we found that KB-R7943 and SN-6 could dose-dependently inhibit resorption pits formation on ivory dentin slices by osteoclasts. Our results suggest that Na⁺/Ca²⁺ Exchanger expressed in mouse osteoclast regulates intracellular Ca²⁺ and might play a role in osteoclast bone resorption.

38. HEK293細胞に過剰発現させた hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel (HCN4) の電気生理学的特性

鄭 明奇, 内納智子, 康 林, 磯本正二郎, 小野克重 (大分大学・医学部・循環病態制御講座)

過分極誘発内向き電流 (I_h) は洞結節細胞の歩調取りに重要な役割を果たす。このI_h電流をencodeする遺伝子の1つであるHCN4は心臓に最も優勢に発現する。pcDNA3.1/zeo-HCN4をtransfectしzeocin感受性を利用して安定発現させたHEK293細胞を用いてHCN4チャネルの電気生理学的性質を検討した。I_h電流は膜電位-60mVから活性化され遅い活性化過程を示した($\tau = 408\text{ms}$ @ -120mV)。膜透過性cAMP (8-cpt-cAMP, 10 μM)によって電流密度が増加し(21%)、特異的遮断剤(ZD7288, 10 μM)によって著明に抑制された(93%)。HCN4チャネルを通過する一価陽イオンのconductance比(G_x/G_K)はNa⁺:0.90, K⁺:1.0, Li⁺:0.81, NH₄⁺:0.61, Cs⁺:0.05であった。またNa⁺と異なり細胞外K⁺濃度依存性(5.4-70mM)にI_h電流密度は増大を示したが、活性化(τ)は20mM以上のK⁺濃度で一定値となった。細胞外K⁺はHCN4チャネルにおける通過イオンとしての働きの他にキネティクスに対する調節機構を有することが示唆された。

39. 神経伝達物質の放出はシナプス前神経終末部の脱分極自体により増強される

石橋 仁(九州大学・医学研究院・分子機能生理学分野)

ラット脊髄後角から機械的に単離した神経細胞にホールセルパッチ法を適用して、自発性抑制性シナプス後電流(IPSC)に対する高K⁺刺激の効果を検討した。細胞外のCa²⁺を除去した条件下でも細胞外K⁺濃度を2.5mMから30mMへ増加すると自発性IPSCの頻度は著明に増加した。このときIPSCの平均振幅も大きくなったが、細胞外にグリシンを投与することによって誘発されるCl⁻電流に変化は認められなかった。従って、細胞外にCa²⁺が存在しない条件下でも、高K⁺刺激による神経終末部の脱分極によって、シナプス前神経終末部からのグリシン放出が増

加すると考えられた。この細胞外 Ca^{2+} -free 溶液中での高 K^+ 刺激による IPSC の頻度増加に対して、電位依存性 Na^+ チャンネル拮抗薬テトロドトキシンおよび電位依存性 Ca^{2+} チャンネル拮抗薬の nifedipine や ω -grammotoxin-SIA は無効であった。一方、BAPTA-AM および thapsigargin の前処

置によって高 K^+ 刺激による IPSC の頻度増加は著明に抑制された。

以上の結果から、神経終末部の脱分極は細胞外 Ca^{2+} に依存せず²に細胞内 Ca^{2+} 放出を起し、神経伝達物質の放出を増強すると考えられた。