

第 59 回日本生理学会中国四国地方会

会 期：平成 19 年 11 月 10 日（土）

会 場：徳島大学歯学部 4 階大講義室

当番幹事：徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子細胞生理学
吉崎和男

参 加 者：66 名

演 題 数：27 題

第 59 回中国四国生理学会は徳島大学歯学部大講義室にて、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部口腔分子生理学・細井和雄教授、同統合生理学・勢井宏義教授、同生体栄養学・二川健教授の協力を得て、一般演題 27 題の発表、活発な討議が行われた。評議員会では新任教授 3 名の紹介と日本生理学会常任幹事会からの報告があった。次期開催は愛媛大学の予定である。

1. ¹H-NMR による拡散画像測定法の開発

早野尚志^{1,2}、北村光夫¹、浜岡建城³、吉崎和男¹（¹徳島大学大学院 HBS 研究部分子細胞生理学、²大津市民病院、³京府医大大学院小児循環器・腎臓病学）

¹H-NMR による拡散係数の測定とその画像計測への応用について報告する。

NMR 装置は Varian 社製 Unity INOVA300swb である。Bore 径 120mm の Oxford 社製 7T 縦型超伝導磁石の中に、最大傾斜磁場 30G/cm まで発生できる Doty Scientific Inc. 社製傾斜磁場コイル（内径 85mm）を備える。その中に内径 57mm のイメージング用 RF コイルがあり、¹H の共鳴周波数 300MHz である。

有機溶媒などの液体を入れた容器を一行に配置し、各容器の液体の拡散係数が同時に計測できるように計測法を改良した。液体の拡散係数の計測にはスピン・エコー信号を用い、一対のパルス傾斜磁場を RF パルスの前後に加えた。このパルス傾斜磁場の強度を変化させて一連の NMR 信号を得た。NMR 信号の計測時には、配列した容器方向に傾斜磁場を加えて位置情報を NMR 信号に周波数変調として記憶させ、フーリエ変換によって一次元の容器の位置情報を得た。計測した拡散係数の値は大きい方からアセトン、水、メタノール、DMSO の順となった。

つぎに、ホルマリン液に保存した単離ラット脳の拡散強調画像ならびに拡散係数計算画像の計測について検討した。拡散の速い分子ほどその NMR 信号が減衰するので、拡散強調画像ではホルマリン溶液中の水分子が最も早く減衰し、脳実質の水分子の信号が相対的に強調された画像がえられた。また、拡散係数計算画像では、脳実質のうち、拡散係数の小さい白質が黒く描写され、細胞成分の多い皮質

が相対的に白く描画でき、髄鞘染色のような画像が得られた。

2. 筋線維タイプを調節するユビキチンリガーゼ MuRF-1 の解析

二川 健、阿部愛波、上西千晶、田村斉子、河野尚平、平坂勝也、岸 恭一（徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部生体栄養学分野）

宇宙フライトや寝たきりにより萎縮した骨格筋では筋量が減少すると共に筋線維タイプも遅筋型から速筋型へと変化する。これまでの研究において、宇宙フライトしたラットの骨格筋内ではユビキチンリガーゼ MuRF-1 が著名に増大することを見出した。本研究では MuRF-1 遺伝子欠損マウスを用いて筋萎縮に対する影響について検討した。MuRF-1 遺伝子欠損マウスは野生型マウスに比べ、坐骨神経切除による筋萎縮に対して抵抗性を示した。興味深いことに、その抵抗性はミオシン重鎖タイプ IIb を多く含む前脛骨筋や腓腹筋に特異的であり、ミオシン重鎖タイプ I、IIa を多く含むヒラメ筋では全く認められなかった。さらに筋萎縮時にはミオシン重鎖タイプ IIa の発現が増大するが、MuRF-1 遺伝子欠損マウスにおいてその発現は有意に抑制されていた。実際に、筋萎縮による筋線維タイプ移行は MuRF-1 遺伝子欠損において全く起こらなかった。これらの結果より、MuRF-1 は筋線維タイプ移行を抑制する因子の一つである可能性が示唆された。

3. 唾液腺腺房細胞の発生・分化・成熟化と水チャネル AQP5 発現

赤松徹也、アズリナ アハマド、ブルワンティヌスク、

カラバシル ミレーバ, 長谷川敬展, 姚 陳娟, 細井和雄
(徳島大院 HBS 研究部口腔分子生理学)

唾液腺の重要な生理機能の一つが唾液分泌であり, 唾液分泌の低下は口腔乾燥症等の疾患とも密接に関わる。唾液分泌を司るのは腺房であるが, 腺房細胞は発生過程で唾液腺上皮の分枝形成に伴い, 介在部導管細胞より分化すると考えられている。本研究では唾液腺腺房細胞の発生・分化・成熟化と唾液分泌に関わる水チャネル AQP5 発現の制御機構について, ラット胎仔顎下腺器官培養系およびヒト唾液腺介在部導管細胞由来 HSG 細胞等を用いて解析した。胎生 15 日目の SD ラット胎仔顎下腺を用いた器官培養系で, 増殖・分化因子の活性化に関わるプロセッシング酵素, PACE4 の機能やその発現を, 阻害剤, 特異抗体, または siRNA 等により抑制した結果, 顎下腺の分枝形成が抑制され, AQP5 発現も抑制された。顎下腺発生過程では腺房細胞の分化・成熟化と共に AQP5 の発現・局在化が認められ, PACE4 発現も腺房細胞の分化・成熟化と密接に関わることが示唆された。この PACE4 発現の調節には二種類の bHLH 型転写因子, Mist1 と Sgn1 の関与が示唆された。HSG 細胞は培養条件により腺房様に分化することが知られており, Mebiol gel にて培養すると腺房様の spherical structure を形成し, この分化誘導過程で PACE4 と AQP5 の発現が増加する傾向が認められた。また, この時 Mist1 の発現も同時に増加する傾向にあり, Mist1 を介して PACE4 発現が上昇し, これにより腺房細胞の分化が促進され, AQP5 発現が誘導される可能性が考えられた。現在詳細について解析中である。

4. 希少糖を含む 47 種類の単糖の HUVEC の増殖および管腔形成への作用と構造活性相関

塚本郁子¹, 小西良士¹, 山口文徳², 窪田泰夫³, 何森健⁴, 徳田雅明² (1香川大学医学部薬物生体情報学, 2同細胞情報生理学, 3同 皮膚科学, 4香川大学希少糖研究センター)

自然界に存在する単糖のほとんどは五炭糖か六炭糖であり, そのひとつである D-グルコースは多くの生物にとって大切なエネルギー源である。六炭糖のアルドース, ケトースは合わせて 24 種類になるが, 自然界に多く見いだされるのは数種に限られ, それ以外は「希少糖」である。これらは D-グルコースのアナログとしていろいろな生理作用が期待されるにもかかわらず, それを網羅的に検討した研究は少ない。

血管新生は組織の発達時, 創傷治癒, ガンの増殖や転移の際に活性化される生理現象のひとつである。本研究ではそのモデルとしてヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) による管

腔形成を観察した。すなわち HUVEC の増殖や管腔形成におよぼす効果を, 24 種の全ヘキソースと 10 種のヘキシトール, その誘導体やアルドペントースを含む 47 種類の単糖を用いて比較を行ない, 構造活性相関を検討した。

D-アロースは D-グルコースの C3 位のエピマーであるが, これと 3-deoxy-D-グルコースは増殖と管腔形成の両方を抑制した。D-グルコースには抑制作用がないので, この活性は D-グルコースが C3 位に有している水酸基の不在に求めることができる。水酸基の不在によってもたらされるのは, 立体障害の解消, または疎水性の上昇であるが, C3 位に大きな疎水基を有する 3-O-methyl-D-グルコースが抑制作用を示したことから, 後者が抑制作用に関与していると考えられた。抑制作用を示した他の糖の構造と合わせて考察する。

5. LPS による耳下腺 AQP5 の発現制御とそのシグナル伝達経路

姚 陳娟, アズリナアハマド, プルワンテイヌヌク, カラバシル ミレーバ, 長谷川敬展, 赤松徹也, 細井和雄
(徳島大院 HBS 研究部口腔分子生理学)

口腔は生体の防御系における最初の関門であり, その中で唾液・唾液腺は重要な働きを担っている。唾液腺の外分泌活動に関しては, 外分泌腺型水チャネル蛋白質, アクアポリンの働きが重要である。本研究では LPS による唾液腺 AQP5 発現制御を雄性 C3H/HeN マウスおよびその TLR4 変異型, C3H/HeJ マウスを実験動物として解析した。まず, RT-PCR および Western blotting により, LPS 腹腔投与 6-24 時間後, C3H/HeN マウス耳下腺において AQP5 と AQP1 の mRNA および蛋白質が減少することを見出した。培養耳下腺において LPS による AQP5 mRNA の減少は NF- κ B および MAPK 経路の阻害剤 PDTC, MG132, AG126, SP600125, および SB203580 により抑制されたが, AQP1 mRNA の減少は AG126 と SP600125 によってのみ部分的に抑制された。Gel shift 解析の結果から, NF- κ B は AQP5 プロモーターの NF- κ B 応答配列へ結合し, そのレベルは LPS 刺激により上昇した。AQP5 の転写活性はこれにより抑制されたと考えられた。更に, 免疫組織化学および Western blot 解析により, NF- κ B の subunit p65 および p-c-Jun は LPS 刺激により増幅され, 核へ移行することが確認された。

結論として, LPS による AQP5 mRNA の減少には NF- κ B および MAPK 経路が関与しているが, AQP1 mRNA の減少には MAPK のみが関与していると考えられた。

6. 新しく開発した透明電極を用いた膜電位光学的多部

位同時記録測定領野内からの脳波測定

廣田秋彦¹, 吉田勇氣², 濱 德行¹, 藤田恭久³, 平川正人⁴, 伊藤眞一¹ (¹鳥根大医神経筋肉生理, ²鳥根大総理工電子機能システム工学, ³鳥根大総理工電子制御システム工学, ⁴鳥根大総理工情報工学)

膜電位変化を光学的に多数ヶ所から同時記録する方法が広く普及しつつあるが, 市販の測定装置では, 生きたままの大脳皮質から落射蛍光法により単一掃引で解析可能なSN比(シグナル・ノイズ比)の記録を得ることは極めて困難である。我々はこの測定法を大脳皮質の自発活動の記録に適用するため, 単一掃引で解析に堪えるだけの高SN比を有し, かつ高い時間空間分解能で記録出来る光学的膜電位測定システムを開発してきている。昨年の学会で, ラット大脳皮質感覚運動野の自発興奮を数百ヶ所から同時に光学的に長時間連続記録することが出来るようになったが, まだSN比が十分では無く, 心拍動由来のアーティファクト等も含めたノイズに埋もれがちな神経のわずかな電気活動を光学シグナルとして確実に捉える為には, 光学測定と同時に大脳皮質表面から脳波を直接記録する必要があることを報告した。しかし, 電極は通常不透明であるため, 光学的に膜電位測定を行っている領野内に置くことは出来ない。そこで, 我々は透明な電極を開発することにした。標本上の光学的測定領域より一回り大きい範囲が覆え, 大脳皮質との接触面が大脳皮質の曲率にほぼ見合った凹面で反対面が平らなガラスを電極の基板とした。この基板の凹面表面に導電体であるガリウム添加酸化亜鉛透明膜をスパッターにより形成し, 電極とする直径約300 μ mの部分以外を二酸化珪素膜で覆い絶縁した。実際にラットの大脳に装着してテストしてみた結果, 感覚運動野の神経活動を光学的に測定している領野内から, 脳波を直接記録することに成功した。電極部に露出している酸化亜鉛膜の毒性や体液というイオン強度が極めて大きい溶液内における耐久性の問題も見られなかった。

7. 血管平滑筋のスフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)誘導異常収縮における膜ラフトの役割

加治屋勝子, 岸 博子, 川道穂津美, 小林 誠(山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学)

血管の異常収縮(血管攣縮)を引き起こす原因として, Rhoキナーゼ(ROK)を介する血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮が注目されている。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)とSrcファミリーチロシンキナーゼの一種であるFynを同定し, 「SPC→Fyn→Rhoキナーゼ→血管のカルシウム非依存性

異常収縮」の経路を見出した。ヒト血管では, SPCによる異常収縮の大きさは, 血清総コレステロール(CHOL)値およびLDL-CHOL値と正の相関を示し, HDL-CHOL値とは逆相関を示した。一方, CHOLは, 細胞膜に均一に蓄積するのではなく, 膜ラフトと呼ばれる, ある特定の膜ドメインに限局して蓄積することが知られている。そこで, 本研究では, SPCによる血管異常収縮における膜ラフトの役割について検討した。血管の異常収縮シグナル分子の細胞内局在を調べると, SPCによりFynとROKは細胞質から膜ラフトへ移動するが, CHOL除去剤により血管組織中のCHOLを選択的に除去すると, SPCによるFynとROKの移動と血管異常収縮が抑制された。また, ラフト人工モデル膜に対するSPCの結合性を調べたところ, 膜中のCHOL濃度依存的にSPCの結合量も増加することが明らかとなった。以上の結果より, CHOLに富んだ膜ラフトがSPCによって引き起こされる血管攣縮のシグナル伝達機構に重要な役割を果たしていると考えられた。

8. 血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮におけるFynチロシンキナーゼの重要性

郭 鳳玲, 川道穂津美, 岸 博子, 加治屋勝子, 小林 誠(山口大学大学院医学系研究科器官制御医科学講座生体機能分子制御学)

血管異常収縮の分子機構としてRhoキナーゼ(ROK)による血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮が注目されている。我々は, ROKの上流因子として, 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を活性化し, カルシウム非依存性収縮を引き起こす事を見出した。そこで, 本研究では, Src-TKの中で, 血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮に関与しているTK分子を同定することを目的とした。ウェスタンブロットでは, Src-TK分子群の中でも, Fynとc-Srcの発現が血管平滑筋に認められた。SPCは, Fynを細胞質から細胞膜へ移動させたが, c-Srcは移動させなかった。RNA干渉(siRNA)によってFynをノックダウンさせた培養血管平滑筋細胞では, SPCによる収縮が著明に抑制された。RNA干渉作用の無いコントロールsiRNAでは抑制作用がなかった。さらに, Fynの役割を検討するため, バキュロ・ウイルスシステムでリコンビナントFynを作製した。 β エスシンによるスキンド血管平滑筋において, 活性型Fynは, カルシウム非依存性収縮を引き起こした。このFynによる収縮は, ROK阻害薬によって抑制された。不活性型Fynは, SPCによる収縮を抑制した。以上の結果から, Fynチロシンキナーゼは, ROKを介した血管平滑筋のカルシウム非依存性収縮において重

要な役割を果たしていると考えられた。

9. 脳弓下器官から正中視索前核への神経路による飲水行動の調節

牛込彰彦^{1,2}, 松下弘二², 宮久保浩子², 丹原香菜子³, 林 泰資³, 田中淳一² (1埼玉純真短期大学こども学科, ²鳴門教育大学授業開発講座, ³ノートルダム清心女子大学人間生活学部)

脳弓下器官 (SFO) でのアンジオテンシン II (ANG II) の受容により生じる飲水行動および昇圧反応に, 視床下部正中視索前核 (MnPO) が関与していることが示唆されている。SFO から MnPO に至る経路には, グルタミン酸および γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性神経が存在することが確認されている。本研究は, ANG II によって誘発される飲水行動の調節に, SFO から MnPO へ投射するグルタミン酸および GABA 作動性神経が関与しているか否かについて明らかにするため, MnPO へのグルタミン酸あるいは GABA 受容体効果遮断薬の前処理が, SFO への ANG II 投与により誘発される飲水行動におよぼす影響を検討した。

Wistar 雄性ラットにおいて, SFO への ANG II (50 pmol) 投与により顕著な飲水行動が誘発されたが, 溶媒 (生理食塩水) 投与による飲水はみられなかった。ANG II 投与による飲水反応 (飲水量) は, MnPO への N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体効果遮断薬であるジゾシルピン (MK801, 15 nmol) あるいはキスカル酸 (AMPA) /カイン酸 (KA) 受容体効果遮断薬である 6-シアノ-7-ニトロキノキサリン-2,3-ジオン (CNQX, 40nmol) の前処理により有意に減弱された。ANG II 投与により飲水を開始するまでの潜時には, MnPO への薬物投与の影響は認められなかった。ANG II 投与による飲水反応は, MnPO への GABA_A 受容体効果遮断薬のピククリン (100pmol) または GABA_B 受容体効果遮断薬のファクロフェン (100 pmol) の前処理により増強されたが, 反応潜時の変化はみられなかった。

これらの結果は, SFO から MnPO へ投射するグルタミン酸作動性神経が ANG II 投与による飲水行動の誘発に関与しており, MnPO の NMDA および AMPA/KA 受容体機構を介して調節されることを示唆している。また, MnPO の GABA_A および GABA_B 受容体機構も ANG II 投与による飲水行動の調節に係わっている可能性を示している。

10. ラット前視床下部神経前駆細胞の分裂と分化による暑熱馴化形成の可能性

松崎健太郎, 片倉賢紀, 丸山めぐみ, 原 俊子, 橋本道男, 紫藤 治 (鳥根大学医学部生理学講座 (環境生理学))

ラットは暑熱馴化により自律性体温調節機能の変化を惹

起するが, その中枢機序は解明されていない。本研究では, 暑熱に暴露されたラットの前視床下部における神経前駆細胞の分裂と分化を解析した。Wistar 系雄ラット (5 週齢) を明暗周期 12:12 時間, 自由摂食・摂水下, 環境温 24°C で 2 週間飼育した後, 32°C の高温環境に暴露した。暴露開始から 1 日後, 11 日後, 21 日後にそれぞれ Bromodeoxyuridine (BrdU; 50mg/kg/day) を 5 日間腹腔内投与した。28 日後, ペントバルビタールで麻酔したラットから脳を摘出し, 前視床下部切片を作成し, 抗 BrdU 抗体および抗成熟ニューロン抗体 (抗 NeuN 抗体) を用いて免疫組織化学的に染色した。暑熱暴露により, ラット前視床下部における BrdU 陽性細胞数が顕著に増加し, その数は暑熱暴露期間に依存していた。さらに, BrdU 陽性細胞の一部は抗 NeuN 抗体によって染色された。これらの結果より, 暑熱馴化によりラット前視床下部の神経前駆細胞が分裂し, その一部が神経細胞に分化することが示唆された。ラット前視床下部における神経細胞新生が暑熱馴化後の体温調節機能の変化を誘導する可能性が考えられた。

11. 脳梗塞巣核心部に集積するマクロファージ様細胞について

田中潤也¹, 松本洋明², 高橋寿明¹, A. Smirkin¹ (1愛媛大学医分子細胞生理, ²愛媛大学医脳神経外科)

ラットの一過性 (90 分間) 中大脳脈閉塞 (MCAO) モデルを用いて, 脳梗塞巣核心部に集積するマクロファージ様細胞の特性を検討した。このマクロファージ様細胞の多くは, マクロファージマーカー Iba1 とオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー NG2 コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (NG2) を発現し, 我々はこれらを BINCs (Brain Iba1+/NG2+ Cells) と称している。BINCs は虚血損傷発症後 7 日目頃をピークに虚血巣で強く増殖していた。BINCs は, 血小板由来増殖因子受容体 α (PDGFR α) とそのリガンドである PDGF-AA を発現し, BINCs は自己分泌性 PDGF-AA 依存的に増殖するものと考えられた。

脳梗塞巣には, NG2 陰性のマクロファージ様細胞も集積し, これらはリンパ系マーカーの CD4, CD8, CD200 を発現し, MALCs (Macrophage-like Lymphoid Cells) と略称する。CD200 の受容体 CD200R は BINCs に発現していた。グリーンラット骨髄を移植したラットに MCAO を施行すると, 脳梗塞巣には GFP 陽性の BINCs と MALCs が存在した。CD200 陽性細胞は, CD200R 陽性細胞の機能を抑制することが知られており, 今回の結果は脳梗塞巣核心部に, 骨髄由来の BINCs と MALCs が存在し, 両者の積極的な相互作用が, 虚血傷害時の病態修飾に大きく関与していることを示唆している。

12. マイクログリア・マクロファージ系細胞の浸潤におけるヘパラーゼの役割

高橋寿明¹, 松本洋明², A. Smirkin¹, 田中潤也¹ (愛媛大学医分子細胞生理,²愛媛大学医脳神経外科)

ヘパラーゼはヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のヘパラン硫酸鎖を分解する酵素であり, 癌の浸潤・転移における機能について注目されている. 今回我々はラット新生仔脳より調製したマイクログリアを用い, マイクログリア・マクロファージ系細胞におけるヘパラーゼの機能について検討した. RT-PCR, Western blot および ELISA 法を用いた解析からマイクログリアはヘパラーゼを発現し, ヘパラン硫酸鎖分解活性を有していた. リポ多糖 (LPS) 無処理マイクログリアでは酵素活性の無いヘパラーゼ前駆体として発現していたが, LPS 処理により活性化させると活性型ヘパラーゼが誘導された. HSPG を含む Matrigel でコートした膜上にマイクログリアを播種しトランスウェル・アッセイを行った. 培養開始 24 時間後にはマイクログリアは血清誘導により Matrigel を通過し膜の裏側へ移動したが, ヘパラーゼ阻害剤はこの細胞移動を濃度依存的に阻害した. またマイクログリアは Matrigel 中の HSPG のヘパラン硫酸鎖を分解して膜の裏側へ移動するが, ヘパラーゼ阻害剤存在下では HSPG のヘパラン硫酸鎖の分解が阻止されていた. マイクログリア・マクロファージ系細胞は脳の発生過程や脳傷害時に脳血管から HSPG に富む血管基底膜を通過し脳実質内に浸潤することが知られている. 今回の結果は, ヘパラーゼがこの脳実質内への浸潤過程に深く関与することを示唆している.

13. 動的運動が認知機能に与える影響: 前頭前野における酸素代謝動態との関連

遠藤加菜, 土持裕胤, 中本智子, 加島絵理, 松川寛二 (広島大学大学院保健学研究科生理機能情報科学)

我々は, 動的運動が認知機能に与える影響についてストループテスト (ST) を用いて定量的に検討している. ST は画面上に表示される色名単語の“カラー”を答えさせる認知機能課題であり, 100 問の回答に要する時間から認知機能を評価する. ST の所要時間は最大運動能力 (MVE) の 40~60% 程度の運動後において短縮したことから, 中程度の運動が認知機能を向上させることを明らかにした. 今回, 運動による認知機能の向上には前頭前野の脳活動が関与するという仮説を立て, 認知機能の変化と前頭前野の脳血流量との関係について調べた. 局所脳血流量は酸素代謝動態から測定し, その変化は脳活動を反映するものと考えた. 20~30 歳代の健康成人 12 名を対象に, MVE の 20%, 40%, 60% に相当する負荷でエルゴメーター運動を 15 分

間実施し, 運動前後に ST を行った. 近赤外分光装置を用いて局所酸素化ヘモグロビン濃度 (O₂Hb) を前額部眉上で連続計測した. ST に対する O₂Hb の変化量 (Δ O₂Hb) をテスト開始前平均からの差分として求めた. O₂Hb は運動開始 5 分後から増加し, その増加は運動中緩やかに続き運動終了後も持続した. また O₂Hb の増加は 40% と 60% 運動時には 20% よりも有意に大きかった. ST に対する Δ O₂Hb はどの強度においても運動前後で等しかったが, O₂Hb の絶対値は 40% と 60% の運動において 20% より高かった. 以上の結果は, 運動による前頭前野の活性化が認知機能の向上に関与することを示唆した. もしこの考えが正しければ, 40~60% の運動において O₂Hb が増加する前に運動を終了した場合, ST の所要時間は短縮しないと考えられる. そこで, 5 分間という短時間運動が認知機能に及ぼす影響を合わせて報告する.

14. 主要尿タンパク質 (MUP) によるマウス培養鋤鼻細胞中でのネスチン陽性神経幹細胞数の増加

権 蓉丹¹, 村本和世¹, 梶 秀人^{1,2} (高知大学医学部生理学講座,²生理学研究所発達生理学研究室環境適応機能発達研究部門)

哺乳動物の鋤鼻ニューロンは, 成熟後も継続的な変性・再生のサイクルを繰り返しており, この神経の再生能力は一生涯保持される. 最近の報告によると, 鋤鼻ニューロンのシグナル発生に重要な TRPC2 チャネルを欠損させたマウスの鋤鼻器は, 出生時には正常であるものの, 成熟していくうちに徐々に鋤鼻ニューロンが脱落していく. この知見は, 発生初期には正常な鋤鼻器でも, その後活動が抑えられると鋤鼻神経幹細胞の再生過程に問題が生じることを示唆している. そこで, 齧歯類の尿中に含まれ, 鋤鼻系の関与する機能に深く関わる主要尿タンパク質 (MUP) に注目し, 鋤鼻ニューロンの発生・分化・成熟および再生過程において, フェロモン情報の入力がかどのように影響を及ぼすのかについて, 培養マウス鋤鼻細胞を用いて検討した. MUP は Balb/c マウス尿を採取後, MUP のみの画分, 揮発性リガンドを結合した画分, 揮発性リガンドのみの画分としてそれぞれ精製した. これらの画分を新生マウス由来の培養鋤鼻細胞に添加し, 1~2 週間後に抗ネスチン抗体, 抗 β -チューブリン (class III) 抗体などを用いた蛍光抗体法によって細胞種とその数の変化について検討した. その結果, MUP (およびリガンド結合画分) の添加により, ネスチン陽性細胞の数が有意に増加することが明らかとなった. MUP による刺激が, 鋤鼻ニューロンの再生 (鋤鼻神経幹細胞の増殖または生存維持) 過程に関与している可能性がある.

15. アンドロゲンによる炎症抑制作用はアポリポ蛋白 E の遺伝子型により変化する

大久保信孝, 鈴木洋司, 満田憲昭 (愛媛大学大学院医学系研究科統合生体情報学講座生理学分野)

【背景】アンドロゲンはエストロゲンと同様に神経保護作用をもつ。この神経保護効果は、抗炎症作用など主に自然免疫系の働きによる可能性が指摘されている。その一方で、我々はアポリポ蛋白 E (アポ E) が自然免疫を制御することを見出した。しかし、これまでにアンドロゲンによる免疫作用とアポ E との関係は知られていない。

【目的】アンドロゲンによる炎症制御作用にアポ E の遺伝子型が関与するかどうかを調べた。

【方法】マウスアポ E をヒトアポ E3, E4 型に置き換えた ApoE targeted replacement マウスから初代マイクログリア細胞を作製した。この培養上清にアンドロゲンを加え、Lipopolysaccharide (LPS) と IFN-gamma により細胞を刺激し、アポ E の遺伝子型によるマイクログリア細胞の活性化の違いを比較した。

【結果】アンドロゲンはマイクログリア細胞からの一酸化窒素や TNF-alpha 分泌量を変化させた。この作用はマイクログリア細胞のアポ E 遺伝子型によって大きく変化することがわかった。

16. オキシトシンと副嗅球シナプス可塑性

方 龍雲¹, 椛 秀人^{1,2} (¹高知大医生理, ²生理研環境適応機能発達)

交尾刺激を引き金として雌マウスに形成される交配雄フェロモンの記憶は、妊娠の維持に不可欠であり、鋤鼻系の最初の中継部位である副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞へのグルタミン酸作動性シナプス伝達の可塑的变化 (長期増強: LTP) によって支えられている。このシナプスの可塑的变化をもたらす記憶情報分子としてすでに、交尾刺激により副嗅球に放出されるノルアドレナリンが同定されている。一方、膣頸管刺激によってオキシトシン (OT) が嗅球に増加するとの知見や、OT 受容体が副嗅球に発現しているとの知見が報告されていることから、ノルアドレナリンのほか、OT も副嗅球のシナプス可塑性に関わる可能性が浮上してきた。そこで、矢状断副嗅球スライス標本を作製し、副嗅球の僧帽細胞の軸索が走行する外側軸索を逆行性に電気刺激することによって誘発される僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプス伝達の可塑性を解析した。10Hz, 20Hz, 50Hz, 100Hz の刺激のうち、20Hz, 50Hz, 100Hz 刺激 (各条件とも合計刺激パルス数は 400) で LTP が誘導されたが、100Hz 刺激が最も安定かつ強固な LTP を誘導した。LTP 誘導に関して閾値下刺激 (200 パルス) のとこ

ろに、OT (2 μ M) を添加すると、強固な LTP が誘導され、OT の LTP 誘導促進作用が認められた。OT の LTP 促進作用は AP5 でも OT アンタゴニスト (desGly-NH₂, d(CH₂)₅[Tyr(Me)², Thr⁴] ornithine vasotocin, 2 μ M) でも遮断された。以上の結果は、OT が副嗅球の NMDA 受容体依存性 LTP の誘導を促進することを示している。

17. 反射性心循環応答を誘発する筋機械受容器は筋腱接合部に存在する

中本智子, 松川寛二, 土持裕胤, 遠藤加菜 (広島大学大学院保健学研究科生理機能情報科学)

運動時にみられる循環調節で重要な役割を果たしている機構として、筋受容器からの反射性制御が挙げられる。骨格筋の歪みや伸張は筋機械受容器を賦活し、その信号は Group III・IV 求心性線維によって循環中枢に伝えられる。その結果、反射性に心拍数 (HR)・動脈血圧 (AP) が増加する。Group III・IV 求心性線維の神経終末は自由神経終末であり骨格筋内に散在すると報告されているが、反射性循環応答で重要な役割を果たす筋機械受容器の局在は不明であった。最近、我々は麻酔ラット下腿三頭筋の他動的ストレッチに対する反射性循環応答が筋腱接合部に投与した局所麻酔薬 (リドカイン) により減少することを報告した (Nakamoto & Matsukawa *J Appl Physiol* 102: 2112-2120, 2007)。今回、除脳ラット下腿三頭筋の等尺性収縮に対する反射性心循環応答に関係する筋受容器の局在を、1) 腱部からの入力を除外するためにアキレス腱切断、そして 2) 筋腱接合部へのリドカイン局所投与という 2 つのプロトコールを用いて検討した。除脳ラットの脛骨神経刺激により下腿三頭筋の等尺性筋収縮 (40 秒間) を誘発した。HR および AP は筋収縮中増加した。この増加は筋弛緩薬で消失したので、筋受容器由来の反射性応答であると考えられる。ラットのアキレス腱を筋側近位 1/3 のレベルで切断し断端を縫合する手術を行い、37 \pm 4 日後に除脳下で実験した。アキレス腱切断後、短期間で断端は結合組織で癒着し、ラットは日常動作が可能であった。しかし、求心性神経の再生は遅延するため、切断部より末梢に存在する受容器由来の応答は消失すると予想した。等尺性筋収縮に対する HR および AP の応答は腱切断側と非切断側の間で相違が認められなかった。この結果は切断レベルより末梢には機械受容器は存在しない、あるいは存在しても反射性心循環応答には関与しないことを示唆した。次に筋腱接合部へのリドカイン局所投与は、筋収縮により発生した張力が等しいにも関わらず、HR・AP の変化量を有意に減少させた。以上の結果は、骨格筋の等尺性収縮においても、反射性心循環応答を調節する筋機械受容器が筋腱接合部に存在することを示唆

する。他動的筋ストレッチは筋の長さおよび筋張力を共に変化させるが、等尺性筋収縮は筋の長さ変化を伴わず、張力のみを変化させる。このように筋の長さ変化の有無にも関わらず、同様な結果が得られたことから、反射性心循環応答を調節する筋機械受容器は主に筋の発生張力に応答すると考えられる。

18. マウスにおける睡眠時の無呼吸と血圧上昇

勢井宏義, 近久幸子 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野)

睡眠時無呼吸症候群は、高血圧など生活習慣病との関連性が指摘されており、その予防・治療に関する研究は医学的に重要な課題の一つである。無呼吸はマウスのレム睡眠期においても観察される。一方、レム睡眠期の血圧も大きく変動し、スパイク様の昇圧が頻回に観察される。今回、EMMS社のplethysmographとDSI社のテレメトリ装置を併用し、マウス(ICR系)におけるレム睡眠期の呼吸と血圧の関連について観察した。まず、脳波、筋電図をテレメトリで記録しながら、各睡眠段階の呼吸様式について観察した(EEG-resp群)。さらに、別の群(AP-resp群)において、呼吸と血圧の同時測定を行った。

EEG-resp群から、マウスのレム睡眠期では無呼吸が観察され、その特徴的な呼吸様式から、逆にレム睡眠期を推定できることを確認した。AP-resp群において、呼吸様式から判別したレム睡眠期では、血圧が上昇し、さらに一過性のスパイク様昇圧も観察された。呼吸回数は、レム睡眠期の初めに最低値をとり、その後、レム睡眠の継続と共に増加した。

平均血圧のレム睡眠期におけるピークは、無呼吸の発生時期とほぼ一致していた。また、スパイク様昇圧は、無呼吸から2秒ほど遅れて発生していた。呼吸賦活薬であるアセタゾラムドの慢性投与は、レム睡眠期の呼吸回数を増加させ、血圧の上昇を抑えた。逆に、外気O₂濃度を50%に上げると、呼吸回数が減少し、血圧の上昇を大きくした。これらの結果から、マウスのレム睡眠期では換気不全のため脳が低O₂あるいは高CO₂状態に陥り、それに対する昇圧反応が起こっているのではないかと仮説される。

19. ヒト筋機械受容器反射による心循環応答—覚醒時と睡眠時の比較

加島絵理, 中本智子, 土持裕胤, 遠藤加菜, 松川寛二 (広島大学大学院保健学研究科生理機能情報科学)

運動時には心拍数(HR)や血圧(BP)が上昇する。これらの循環反応は、セントラルコマンドと共に、運動筋の機械的ならびに代謝的受容器からの反射によるものと考えら

れる。麻酔動物において下腿三頭筋を他動的にストレッチすると、HRやBPが反射性に上昇することから、筋機械受容器反射は循環応答に重要な役割を果たしている。しかし、意識動物にmechanosensitive channelsを阻害するgadoliniumを投与したところ、gadoliniumは動的ならびに静的運動時にみられるHRやBPの増加に影響を与えなかった(Matsukawa et al. Am J Physiol, 2007)。この結果から意識下では筋機械受容器反射が中枢性に抑制されているのではないかと着想した。覚醒したヒトに同様の他動的ストレッチを行った場合、HRの軽度な増加がみられる。しかし、ヒト無意識下でみられる他動的運動に対する心循環応答はほとんど不明である。そこで、ヒト睡眠時に中枢性の抑制を少なくした状態で他動的運動を行うことで、心循環応答が覚醒状態と比較してどのように変化するかを調べた。20歳代の健康男性7名に仰臥位での自転車エルゴメータによる他動的運動(60rpm, 30sec)を行い、HRおよびBPの応答を覚醒時と睡眠時と比較した。睡眠深度の判定にはBispectral Index, HR, BPならび呼吸状態を用いた。覚醒時の他動的運動は、HR、毎分心拍出量(CO)および一回拍出量(SV)を増加させ、末梢血管抵抗(TPR)を減少させた。BPは変化しなかった。睡眠時の他動的運動はHR, CO, TPRを覚醒時の応答よりも大きく増減させた。BPおよびSVの応答は覚醒時とほぼ同様であった。これらの結果から、ヒト覚醒時より睡眠時の運動において筋機械受容器反射が心循環系に強く影響を与えると考えられる。

20. 赤血球の酸化障害に対するGinseng由来サポニン分画の保護効果

鈴木洋司¹, 大久保信孝¹, 寒川慶一², 前田信治¹, 満田憲昭¹ (¹愛媛大学大学院医学系研究科統合生体情報学講座生理学分野, ²同 生体機能解析学講座機能組織学分野)

赤血球は肺と末梢組織の間を循環し酸素運搬を行うために酸化ストレスを受け易い。我々はこれまでに、Ginseng由来のサポニンには赤血球への酸化ストレスに対する保護効果があることを発表した。その有効成分については不明のままであった。そこで、酸化ストレスを加えた赤血球の流動挙動に対する各種サポニン分画の効果を調べた。

【方法】健康成人から採取した赤血球を洗浄後、酸化ストレスとして、0.5mM硫酸鉄と2.5mMアスコルビン酸存在下(0-0.05mg/mlサポニン分画を含む)で37度1時間処理した。処理後、赤血球浮遊液をヘマトクリット45%に調整し、円錐—平板型粘度計で粘度を測定した。

【結果】酸化ストレスを加えると、赤血球浮遊液の粘度は増加した。サポニン存在下で酸化ストレスを加えた場合は、粘度の増加を抑制した。diol系サポニン分画では粘度増加

を抑制しなかったが、triol系サポニン分画の一部である Ginsenoside-Rg2 分画および Ginsenoside-Rh1 分画で抑制が認められた。

赤血球に加わる酸化ストレスに対する保護効果は、サポニンの triol 系分画にあることが示された。

21. 混合ハーブエキスの摂取は仔の記憶を促進する

奥谷文乃, 川久保真衣, 椛 秀人 (高知大学医学部生理)

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覚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。未開験の幼若ラットに電撃とにおいを対提示するとそのにおいに対する嫌悪学習が成立する。このメカニズムとして体性感覚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、嗅球内におけるシナプス可塑性を誘導すると考えられる。

センテラ (ツボクサ) などのハーブエキスには記憶力向上、血流改善、酸化などの作用があることが古くより知られているが、その科学的根拠が十分に得られていない。そこで、今回上記のにおいの嫌悪学習モデルを用いて、母体に投与された混合ハーブエキスの、仔に対する効果を検討した。

混合ハーブエキスを混合させた特殊繁殖用飼料を妊娠期間中に母ラットに投与し、その母から生まれた生後 11 日目のラットに電撃とにおいの対提示トレーニングを施し、さらに 12~14 日目におい嗜好性テストを行った。

通常の繁殖用飼料ではトレーニングの 2 日後ではにおいに対する嫌悪反応が低下するが、混合ハーブエキスを妊娠前半期間に投与された母ラットから生まれた仔では、有意な嫌悪反応を認め、記憶がより持続していることがわかった。これは妊娠前半における神経系の発生時期に、シナプス可塑性を促進させるような変化が誘導されたと考えられる。

22. 発酵オタネニンジンの慢性摂取がヒト睡眠の First-night effect に与える効果の検討

北岡和義^{1,2}, 内田 薫³, 岡本直子³, 近久幸子¹, 宮崎寿次⁴, 勢井宏義¹, 武田英二³ (¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部統合生理学分野, ²同 分子細胞生理学分野, ³同 臨床栄養学分野, ⁴長瀬産業株式会社研究開発センター)

睡眠ポリグラフ記録の際、睡眠構造は第一夜目において総睡眠時間・睡眠効率の減少、中途覚醒および Stage 1 の増加、REM 睡眠の減少、睡眠潜時・REM 潜時の延長などの変化を示す。この現象は First-night effect として知られ

ており、その要因として睡眠環境の変化というストレスに対する反応であると考えられている。

オタネニンジン (*Panax Ginseng* C.A Mayer, Araliaceae) は日本、韓国、中国などにおいて一般的に用いられている漢方食材であるが、近年の研究により抗ストレス、抗不安効果が認められることが報告されている。その作用機序としてはオタネニンジンに含まれるサポニンであるジンセノシドが腸内細菌によって分解されて生成される compound-K の生理活性によるものであると考えられているが、腸内細菌によるジンセノシド分解能は個人によって異なるために安定的な効果を得られにくいとされている。

そこで我々はオタネニンジンをおおまかじめ乳酸菌を用いて発酵させた発酵オタネニンジンを開発した。そして First-night effect をストレス評価系として利用し、発酵オタネニンジンおよびプラセボの一週間の経口摂取により First-night effect の出現様式に変化がみられるかどうかについて検討を行った。

結果として、発酵オタネニンジン群はプラセボ群と比較して第一夜目での有意な総睡眠時間、睡眠効率の増大、覚醒時間、中途覚醒回数の短縮が認められ、発酵オタネニジンはストレスにより誘導される First-night effect を緩和しうることが示唆された。

23. 膵β細胞特異的ドミナントネガティブ Cdk5 発現トランスジェニックマウスの作製

大谷理浩¹, 富澤一仁¹, 大島登志男², 西木禎一¹, 大守伊織¹, 御子柴克彦², 松井秀樹¹ (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学, ²理化学研究所脳科学総合研究センター発生神経)

Cyclin-dependent-kinase 5 (Cdk5) はセリン・スレオニン指向性リン酸化酵素であり、神経細胞に豊富に存在し、シナプス伝達・神経可塑性などを制御している。我々は、膵臓β細胞においても Cdk5 ならびにその活性化因子 p35 が存在し、L 型電位依存性 Ca²⁺チャネルをリン酸化することによりインスリン分泌を制御していることを明らかにした (*Nat Med* (2005) 11, 1104)。また、今年の 6 月に、独立した 4 つのグループがそれぞれ 2 型糖尿病患者の大規模 SNPs 解析を実施し、4 報すべてにおいて CDKAL1 が最も有意に SNPs が認められたと報告した (*Science* (2007) 316, 1331; *Science* (2007) 316, 1336; *Science* (2007) 316, 1341; *Nat Genet* (2007) 39, 770)。CDKAL1 は、内因性の Cdk5 活性阻害分子と考えられており、膵β細胞における Cdk5 活性異常と 2 型糖尿病発症の関連性について注目されている。

今回我々は、膵臓β細胞特異的にドミナントネガティブ

Cdk5 を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、膵臓β細胞におけるCdk5の役割について解析した。このマウスの膵島では、Cdk5活性が、野生型マウスと比較し約50%低かった、また、組織学的に膵β細胞数の減少が認められた。さらに、空腹時糖負荷試験により、6週齢から高血糖を示す傾向があり、加齢とともに増大していった。血中HbA1c値は、野生型マウスより高値を示した。以上のように、トランスジェニックマウスにおいて膵β細胞の発生・機能に異常を認める結果が得られた。今後更なる解析により、このマウスが新たな糖尿病モデルマウスになるとともに、β細胞におけるCdk5の発生学的役割を見出す可能性があることが示唆された。

24. カルシニューリンAβの恒常的活性体は発毛メカニズムに関与する

藤村篤史, 富澤一仁, 西木禎一, 大守伊織, 松井秀樹 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学)

発毛メカニズムは複雑でこれまで様々な因子の関与が指摘されてきた。免疫抑制剤による多毛症を端緒に発毛との関連が指摘された脱リン酸化酵素、カルシニューリン(CaN)による転写調節因子NFATの核移行経路もそのひとつであるが、その詳しい機構は不明である。

今回我々は、CaNのcatalytic subunitであるAβの恒常的活性体がケラチンサイト内で発現していることを発見し、さらにこのCaN/NFAT経路の下流にある因子として、細胞周期停止に関与する非典型的サイクリンであるCyclin G2を新たに同定した。我々が開発したNFATの核移行を特異的に阻害する細胞膜透過性ペプチド、11R-VIVITを軟膏にてヌードマウスに塗布すると、局所的に強力な発毛が誘導された。この現象は、毛包内ケラチンサイトにおいて恒常活性状態にあるCaN-AβによるNFATの脱リン酸化が阻害され、その結果Cyclin G2の発現が阻害され細胞増殖および発毛を誘導したことが明らかになった。我々の今回の発見は、発毛のみならず広く皮膚疾患の基礎的理解の一助となるものと考えている。

25. Microfluidic sperm sorterで分離される精子の $[Ca^{2+}]_i$ 測定系構築

松浦宏治, 黒田ユカ, 片野坂友紀, 毛利 聡, 成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム循環生理学)

我々はマイクロ流体原理を利用した運動性良好精子分離装置 (Microfluidic Sperm Sorter : MFSS) によって、精子にダメージを与えることなく運動性良好精子を回収するシステムを開発している。この装置によって、2層流間の界面

を移動することができる運動精子のみが回収される。運動性だけでなく層流間を移動できる精子の $[Ca^{2+}]_i$ を評価することは、当装置で分離される精子機能の解明につながる。

その前段階として、マイクロチャンネル内で精子の運動性と $[Ca^{2+}]_i$ を同時に評価できる測定系を構築している。本発表では、約50ms分解能の時分割共焦点像が得られ、それらから4D画像を構成することにより精子の運動性と $[Ca^{2+}]_i$ の相関について得た知見を報告する。

ヒト精子をFluo-3 AMで染色した後マイクロチャンネル内に入れ、 $[Ca^{2+}]_i$ 由来の蛍光を観測した。観測された精子の運動性と $[Ca^{2+}]_i$ の空間分布から、マイクロチャンネルの端に頭部を付けて尾部を振動させている精子と比較して、0.1 mm/sec程度で泳いでいる精子の尾部の蛍光強度が極めて大きかった。このことから、相対的に尾部の $[Ca^{2+}]_i$ 強度が大きい精子が層流の界面を横切ることができると推察される。今後、マイクロ流体中で層流間を渡る精子とそうでない精子を実際に観測することを目指し、MFSSが有する分離能を検証する。

26. The effects of PPAR α agonist on circadian rhythms of sleep and body temperature in mice

S. Chikahisa¹, H. Sei¹, K. Kitaoka¹, K. Oishi², S. Shibata³, N. Ishida² (¹Department of Integrative Physiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ²Clock Cell Biology Research Group, Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, ³Division of Physiology and Pharmacology, School of Science and Engineering, Waseda University)

PPARs (peroxisome proliferators-activated receptors) are ligand-activated transcription factors belonging to the nuclear receptor family. PPAR α , the isoform of PPARs, play a role in lipid metabolism. Beyond metabolic effects, recent study showed that PPAR α is involved in circadian clock control. It is reported that mice treated with bezafibrate, which is an anti-hyperlipidemic PPAR α ligand, showed phase-advanced locomotor activity. We examined whether chronic bezafibrate treatment would alter sleep and body temperature rhythm and sleep construction. Mice were fed with a control diet for two weeks, and were recorded body temperature, electroencephalogram and electromyogram for 48 h, under light-dark (LD) conditions. After the baseline recording, these mice were fed with bezafibrate containing diet for two weeks, and then same recordings were carried out. Acrophase of rhythm for

body temperature was about 2 h advanced after 2-week feeding of bezafibrate in comparison with the baseline. Sleep-wake rhythms were also phase-advanced about 3 h. Furthermore, bezafibrate treatment increased the EEG delta power (0.8-4.0Hz) in non rapid eye movement (NREM) sleep compared to the baseline. The advanced acrophase of body temperature and sleep-wake rhythm and increased delta power by feeding with bezafibrate were returned to the baseline level after 5 weeks feeding with control diet. These data suggest that chronic bezafibrate treatment could advance a sleep-wake and body temperature rhythm as seen in locomotor activity, and PPAR α might be involved in the regulation of delta power in NREM sleep.

27. 新規塩化物イオン測定法に対する共存物質の影響

稲垣明浩¹, 林 美喜夫², 中野恵文² (¹徳島大院ヘルスバイオサイエンス研究部分子細胞生理学分野, ²鳥取大地域学部地域環境学科)

塩化物イオン (Cl⁻) は生体内の陰イオンとして大きな比率を占め、血漿中における濃度の変化及び測定結果は臨床上の指針として広く用いられている。ただ、それに用いられている方法は主に電極法であり、精度の高いイオン電極を用いるには少なくとも 10 mL 程度の液量が必要である。

また、原子吸光度計や電量滴定法などの専用の装置は非常に高価であり、置いてある研究機関は少ないのが現状である。1 滴滴下するだけで測定できるカード式の塩分計は安価に入手できるが、実は Na⁺ を測定して NaCl 量として表示しているものである。臨床系で古くから用いられていた Cl⁻ 濃度測定法は硝酸銀や硝酸第二水銀を用いるなど、廃液の問題も含んでいる。

近年、微量分析法の一つとして、反応速度の変化量をもとに物質量を測定する接触分析法が注目を浴びている。臭素酸塩存在下における 1,1-ジフェニルヒドラジンとクロモトローブ酸の酸化カップリング反応を用いた塩化物イオンの反応速度分析法は、中学校の理科教育に用いられるほど、簡便で変色反応がはっきりしており、さらに廃液の問題が少ない。ただ、水質検査に用いることを念頭に開発されたので、尿や血液、その他の分泌液の測定に応用する際に、生物特有の物質による影響は検討されていなかった。

本研究では Cl⁻ に対する陽イオンとしては Na⁺・K⁺・NH₄⁺ の違いを、共存物質としてはグルコース・尿素をはじめとした 13 種類の物質の影響を検討した。また、少ないサンプル量でも測定が可能かも検討した。その結果、陽イオンの違いは測定に影響しないこと、尿素以外の物質は尿や血液などに含まれる程度の量では有意な影響が見られないこと、サンプル量は 120 μ L でも測定が可能であることが判った。