

第59回西日本生理学会

会 期：平成20年10月3日（金）、4日（土）
 会 場：崇城大学市民ホール
 当番幹事：熊本大学大学院医学薬学研究部知覚生理学 宋 文杰
 熊本大学医学部保健学科生理機能検査学 羽山富雄
 参加者：111名
 演題数：41題

第59回西日本生理学会は崇城大学市民ホール大会議室にて、熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学分野・富澤一仁教授、熊本大学医学部保健学科・二科安三教授の協力を得て遂行された。41題の口演発表があり、活発な議論が行われた。「日本生理学会九州奨励賞」には、8題もの応募があり、5名の審査員によって厳正なる審査が行われた結果、九州大学大学院・薬学研究院・病態生理学分野・藤田慶大氏「水素水はパーキンソン病モデルマウスにおいてドパミン神経細胞死を抑制する」、九州大学大学院・医学研究院・統合生理学分野・古賀浩平氏「in vivo バッチクランプ記録法を用いたラット一次体性感覚野における痛覚応答の解析」の2名が受賞した。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。次回開催は福岡歯科大学の予定である。

A1. 水素水はパーキンソン病モデルマウスにおいてドパミン神経細胞死を抑制する

藤田慶大¹、清家稔博¹、山川裕希子¹、大野みずき²、山口浩雄²、山田英孝²、高木厚司³、城戸瑞穂⁴、中別府雄作²、野田百美¹（九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野、²九州大学生体医学防御研究所脳機能制御学分野、³九州大学大学院医学研究院統合生理学分野、⁴九州大学大学院歯学研究院硬組織構造解析学分野）

水素分子（H₂）は、生体内で産生される活性酸素のうち最も毒性の高いとされるヒドロキシルラジカル（OH）を選択的に減少させることにより、酸化ストレスが原因とされる様々な疾患に効果的であることが近年報告されている。難治性神経変性疾患の代表例であるパーキンソン病も、酸化ストレスと病態との関連性が強く示唆されている。我々は、パーキンソン病の病態モデルである1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine（MPTP）を投与したマウスを用い、水素ガス溶解水（水素水）を飲水させることにより黒質線条体のドパミン神経細胞の脱落が軽減することを見出した。MPTP慢性投与モデルでは、行動学的変化（自発運動低下）も水素水によって改善された。MPTPによって発生する黒質線条体経路の活性酸素種を可視化したところ、水素水で有意に抑制された。また、DNA酸化損傷のマーカーである8-oxoguanineの線条体における蓄積も水素水で抑制された。これらの結果から、水素水は酸化ス

レスによる神経細胞死を抑制することが示唆された。さらに、水素水はMPTP投与後に飲水を始めても効果があったことから、パーキンソン病発症後においてもその進行を防ぐことができる可能性が期待でき、様々な酸化ストレス疾患に対する予防・治療方法として効果が期待できる。

A2. 乳児の泣き声刺激に対する生理学的反応の男女差について～ERPを指標として

土居裕和¹、宮崎さつき²、田中 佑²、篠原一之¹（¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・神経機能学分野、²長崎大学医学部）

乳児の泣き声は、養育者に乳児の心理的・生理的状态を知らせる重要なシグナルである。乳児の泣き声を感知し、それに対して迅速に注意定位を行うことは、母親及び、将来的に母親となる可能性がある女性にとって、極めて重要な意味を持っているため、女性には乳児の泣き声に対して迅速に注意定位を行う生物学的メカニズムが備わっていることが推察される。しかし、この可能性を検討した研究はほとんどない。そこで、本研究では、乳児の泣き声刺激に対する注意定位反応の性差を、事象関連電位（ERP）成分を指標として検討した。実験では、男性11名、未経産女性13名を対象に、乳児の泣き声及び、物理的変数が泣き声刺激と等しくなるよう統制された無意味な音刺激（コントロール刺激）に対する注意定位時のERPを測定した。分析では、

音刺激に対する注意定位反応を反映する P3a 成分に着目した。P3a は、注意定位が迅速に行われるほどその振幅が大きくなることが知られている。P3a 振幅を、男女間で比較した結果、女性では、コントロール刺激よりも乳児の泣き声刺激に対して、P3a の振幅が大きくなったが、男性ではこのような傾向は見られなかった。これらの結果から、女性は、乳児の泣き声刺激に対して、特異的な反応を示し、迅速な注意定位を行う能力を有している可能性が示唆された。

A3. Relaxin-3 のラット脳室内投与による Fos 蛋白の脳内発現分布および飲水行動への影響

大坪広樹¹、尾仲達史²、鈴木仁士¹、加藤明子¹、轟美和子¹、藤原広明¹、上田陽一¹ (¹産業医科大学・医学部・第1生理学、²自治医科大学・医・生理学・神経脳生理学)

Relaxin-3 は、insulin like peptide-7 と呼ばれ、insulin superfamily に属する relaxin family の1つとして、2002年にヒトゲノムデータベースより同定された新規ペプチドである。Relaxin-3 は、脳と精巣に発現しており、その中枢性作用としては、摂食を促進することが報告されているが、詳細は不明である。そこで、今回我々は relaxin-3 をラット脳室内に投与し、脳内での Fos 蛋白の発現分布および飲水行動に与える影響について検討した。その結果、(1) Relaxin-3 を脳室内投与したラットの脳では、終板器官、第3脳室前壁腹側部、脳弓下器官、視索上核、室傍核などに著明な Fos 蛋白の発現を認めた、(2) ラットの飲水行動は relaxin-3 を脳室内投与することによって促進された。以上より、relaxin-3 は中枢性生理作用を有し、体液調節に影響を及ぼすことが示唆された。

A4. ラットにおける回避行動の社会的学習

増田 明、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)

別個体から必要な情報を受け取り、環境適応に利用する「社会的学習」は集団で生きるために重要な機能である。ラットは電撃や毒に対する回避を他者に伝えることが知られているが、危険な状況から安全な状況へと環境が変化する場合の社会的伝達様式は不明である。また回避行動の社会的学習の学習経験依存性も明らかでない。本研究では個体の事前の回避学習経験に焦点を当て、状況に応じて回避行動の社会的学習がどう行われるか系統的に調べた。また社会的機能に重要な役割を果たしていることが明らかになっている前頭眼窩野をキノリン酸で破壊し、社会的学習機能への影響を調べた。明暗2室からなるチャンパーを用いた受動的回避学習課題を経験した学習群と経験のない未学習群を単独または2匹のペアで回避試験を施行した。学

習ラットは安全な状況下で未学習ラットの共存により回避行動が抑制され、危険な状況下では回避行動が増強された。一方、未学習ラットの回避行動はいずれの場合も変化しなかった。前頭眼窩野破壊ラットでも、安全な状況下での回避行動の抑制は擬手術群と同程度みられた。社会的な回避の抑制は、前頭眼窩野を介さないことが示唆される。本研究はラットの社会的学習における個体の経験の重要性を示し、経験を持つ個体の社会的な環境適応の例を新たに見出した。

A5. α_1 受容体刺激によるマウス心筋型 $I_{Cl,swell}$ の抑制に PIP_3 減少が関与する

市島久仁彦、山本信太郎、顛原嗣尚 (佐賀大学・医学部・生体構造機能学・器官細胞生理)

マウス心室筋細胞における α_1 受容体刺激による膜伸展感受性 Cl 電流 ($I_{Cl,swell}$) の抑制機構を、全細胞電流記録法にて検討した。Phenylephrine (PE: α_1 受容体作動薬) は、低浸透圧刺激による $I_{Cl,swell}$ 活性化を用量依存的に抑制した。この作用は、prazosin (α_1 受容体拮抗薬) や U-73122 (PLC 阻害薬) 投与、抗 Gq 蛋白抗体の細胞内投与で減弱した。種々の PKC 阻害薬投与では変化のないことから、PE の作用は α_1 受容体-Gq 蛋白-PLC を介するが、PKC には非依存性であると考えられた。次に、PLC によって水解される PI (4, 5) P_2 を細胞内投与すると、PE の電流抑制作用は減弱した。一方、PI3 キナーゼ (PI3K) は、PI (4, 5) P_2 から PI (3, 4, 5) P_3 への変換に関わり、細胞内 PI (3, 4, 5) P_3 レベルの維持に寄与するが、この酵素の阻害薬である LY294002 を細胞内に投与すると、PE 投与時と同様に、 $I_{Cl,swell}$ 活性化は抑制された。以上より、心筋 $I_{Cl,swell}$ への PE の抑制作用に、PI (3, 4, 5) P_3 減少の関与が示唆された。また、PI3K の作用が低下する糖尿病モデルマウスを用いた実験においても、PE 投与時と同様に、 $I_{Cl,swell}$ 活性化は抑制されていた。

A6. ラット脊髄後角膠様質ニューロンの膜興奮性に及ぼすガラニンの二相性作用

岳海源、藤田亜美、柳 涛、朴 蓮花、水田恒太郎、友廣大輔、青山貴博、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))

脊髄後角の痛み伝達制御におけるガラニンの役割を知るために、ラット脊髄薄切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用して、ガラニンがシナプス伝達に及ぼす作用を調べた。低濃度のガラニンは自発性 EPSC の振幅を変えずに発生頻度を増加させる一方 ($EC_{50} = 0.0029 \mu M$)、高濃度のガラニンは $-70 mV$ で外向き膜電流を誘起した ($EC_{50} = 0.044 \mu M$)。これらの作用は Na^+ チャネル阻害薬テ

トロドトキシンにより影響を受けず、前者の作用はガラニン受容体 (GalR)-2/3 作動薬 galanin 2-11 により、後者の作用は GalR-1 作動薬 M617 により特異的に見られた。この自発性 EPSC 発生頻度増加は無 Ca^{2+} 液中や電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤 La^{3+} 存在下で見られなかった。ガラニンは GABA およびグリシンを介する自発性抑制性シナプス伝達には作用しなかった。以上より、ガラニンは低濃度で GalR-2/3 を活性化して細胞外から細胞内への Ca^{2+} 流入量を増加させてグルタミン酸放出を促進する一方、高濃度でシナプス後細胞の GalR-1 を活性化して膜過分極を起こすことが明らかになった。ガラニンは膠様質ニューロンの膜興奮性を低濃度で増加、高濃度で減少させることが示唆される。この結果は、ガラニンが濃度に依存して痛み行動を二相性に制御するという報告と一致する。

A7. *In vivo* パッチクランプ記録法を用いたラット一次体性感覚野における痛覚応答の解析

古賀浩平^{1,2}, 水口洋子¹, 古江秀昌¹, 赤池紀生², 吉村恵¹ (¹九州大学大学院医学研究院統合生理学分野, ²熊本保健科学大学生命科学研究部門)

第一次体性感覚野 (SI) は、刺激部位の識別に重要な役割を果たすと考えられている。近年、SI は刺激位置の局在だけでなく、痛みにも関与する事が PET や fMRI の研究で報告されている。しかしながら、その時間分解能と場所分解能には限界があり、細胞レベルの詳細な解析は十分に行われていない。今回我々は、ウレタン麻醉下のラットから *in vivo* パッチクランプ記録を行い、SI ニューロンの膜電位変化を電流固定下で解析した。皮膚へブラシ刺激を加えて皮質深層の細胞の受容野を同定した後、ピンチ刺激を加えた。しかしながら、ピンチ刺激には触情報と侵害情報が混在していることから厳密に応答を分けることが出来ない問題点があるので、次に非接触型のハロゲン光を用いて受容野に 50℃ の侵害性熱刺激を加えた。その結果、刺激前と比較して活動電位の頻度が 20% 以上増加する細胞が全体の約 30% の細胞で観察された。また、アセトンによる冷刺激を加えた結果、約 20% の細胞で活動電位の頻度が増加するニューロンが観察された。これらのことから SI は痛み刺激にも応じる事が示唆された。

A8. 抑制性単一シナプス前終末部への揮発性麻酔薬作用

小川幸恵^{1,2}, 申 敏哲¹, 山鹿敏臣¹, 田中永一郎², 小谷直樹³ (¹熊本保健科学大学電気生理学, ²久留米大学大学院医学研究科脳・神経機能部門, ³越谷クリニック)

揮発性麻酔薬が単一シナプス前終末部へいかに作用する

かは全く知られていない。本研究では、海馬 CA1 ニューロンに投射する単一 GABA 作動性神経終末からの自発性及び活動電位誘発性の GABA 遊離によって惹起されるシナプス後電流 (mIPSC, eIPSC) を指標にして、揮発性麻酔薬である Halothane (Hal), Sevoflurane (Sev), Isoflurane (Iso), Enflurane (Enf) の効果を比較検討した。

臨床濃度の Hal, Iso, Enf は mIPSC 放出頻度を上昇させたが、Sev は無効であった。またこれら 4 種類の麻酔薬は、mIPSC の電流振幅とそのキネティクスに影響を与えなかった。

Hal は eIPSC の遊離成功率 (R_{suc}) と電流振幅を共に増加させた。Sev は R_{suc} には無効であったが、電流振幅を抑制した。Iso と Enf は eIPSC の電流振幅と R_{suc} を共に抑制した。Sev のみが eIPSC のキネティクスを延長させた。以上の結果から Hal による eIPSC 電流振幅の増大、Sev, Iso, Enf による抑制は、放出される GABA 量の増加又は抑制に起因し、従来考えられていたようなシナプス下膜 GABA_A 受容体の修飾にはよらない可能性が示唆された。

A9. ラット炎症性疼痛モデルにおける GABA・グリシンの相互作用

島田秀樹, 吉村 恵 (九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

脊髄後角において、抑制性神経伝達物質である GABA とグリシンは、侵害刺激の調整に重要な役割を果たしており、また近年、炎症性疼痛との関連性も指摘されている。先行研究では、ラット炎症性疼痛モデルにおいて、GABA_A 受容体におけるサブユニット構成の変化や、GABA 作動性自発性微小シナプス後電流 (mIPSC) の増加、グリシン作動性 mIPSC の減少、などが報告されている。しかしながら現在のところ、炎症時における GABA とグリシンの相互作用については、充分には解明されておらず、また mIPSC のキネティクスの変化も研究されていない。そこで我々は今回、幼若ラット炎症性疼痛モデルを用い、脊髄後角から機械的に単離したニューロン (シナプス・ブートン標本) にホールセルパッチ記録法を適用し、GABA, グリシンそれぞれの mIPSC の decay time を、二つの指数関数成分に分け研究を行った。その結果、炎症時では mIPSC の decay time に変化が見られ、また GABA, グリシンそれぞれのものとは異なるキネティクスが認められた。これらの事から、炎症過程における、抑制性シナプス応答の新たな可塑的変化が示唆された。

A10. 脊髄後角膠様質における抑制性シナプス応答に対するノルアドレナリンとミダゾラムの相乗作用

前田愛子, 吉村 恵 (九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

【目的】脊髄表層の膠様質は、脳幹より下行性の痛覚抑制神経の密な投射があるなど、侵害情報の伝達およびその修飾に重要な役割を果たすと考えられており、近年、この部位における多くの麻酔薬の詳細な作用解析が行われている。本研究では、鎮静薬として使用しているミダゾラムが脊髄膠様質において、ノルアドレナリンの痛覚抑制作用を増強し、鎮痛の補助的役割を果たすか否か検討を行った。【方法】成熟ラット脊髄スライス標本を作製し、脊髄膠様質細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。電位固定下で自発性の抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録し、ノルアドレナリンおよびミダゾラムをバースアプリケーションした。【結果】記録したすべての膠様質細胞において自発性の IPSC が観察された。これらの IPSC は GABAA あるいはグリシン受容体の拮抗薬で抑制された。ノルアドレナリンを投与すると、GABA およびグリシン作動性の自発性 IPSC の発生頻度が著明に増大した。ミダゾラムは、GABA 作動性の自発性 IPSC の decay phase を延長させた。しかし、これらの単独投与では自発性 IPSC の加重はほとんど見られなかった。一方、ノルアドレナリンとミダゾラムを同時投与すると、自発性 IPSC の発生頻度と decay phase が延長し、IPSC の加重が多くの細胞で観察された。【結論】ミダゾラムは、ノルアドレナリンの脊髄膠様質における抑制性シナプス応答に対する作用を増強し、相乗的に痛みの伝達を抑制する事が示唆された。本結果は鎮静薬であるミダゾラムが脊髄において鎮痛補助薬として作用する可能性が示された。

A11. CaMK IVノックアウトマウスを用いた行動薬理的および電気生理学的検討

歌 大介¹, 阪上洋行^{2,3}, 古江秀昌¹, 古賀浩平¹, 近藤尚武², 吉村 恵² (¹九州大学大学院医学研究院統合生理学分野, ²東北大学大学院医学研究科細胞生物学講座, ³北里大学医学部解剖学教室)

Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ IV (CaMK IV) は、種々のタンパク質を基質とする多機能型 Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ (CaMK) の一つで、神経細胞内の核内に豊富に局在することより、cAMP response-element binding protein (CREB) のような転写因子をリン酸化することにより遺伝子発現の制御に関与すると考えられている。CaMK IV は、シナプスの可塑性、学習や記憶に重要な役割を果たすとされている。しかしながら、CaMK IV の機能についてはまだ十分にわかっていない。そこで、今回「痛み」に注目し、野生型マウスと CaMK IV

ノックアウトマウスを用いて行動薬理的および、電気生理学的に実験・解析を行った。まず、侵害刺激感受性テストでは、野生型マウスに比べ CaMK IV ノックアウトマウスの方が刺激に対する閾値が高いことがわかった。さらに、後根を付した脊髄冠状断スライスを作成し、後根刺激によって誘起されるシナプス応答を脊髄後角膠様質細胞からパッチクランプ記録し、脊髄における痛覚情報回路などについて解析を行った。この結果後根刺激によって誘起されるシナプス応答の閾値が、野生型マウスに比べ CaMK IV ノックアウトマウスの方が高い傾向にあった。これは、行動学的実験を支持するものであった。

A12. ガン性疼痛モデルにおける痛覚伝達系異常の行動学的および電気生理学的解析

柳澤義和^{1,2}, 古江秀昌², 川股知之³, 歌 大介², 並木昭義³, 岩本幸英¹, 吉村 恵² (¹九州大学大学院医学研究院臨床医学部門外科学講座整形外科学分野, ²九州大学大学院医学研究院統合生理学分野, ³札幌医科大学麻酔学講座)

転移性骨腫瘍は時に難治性疼痛を来し著しい QOL の低下を来すことがある。そのため最近ではラットやマウスの長管骨髄腔内に腫瘍細胞を注入するガン性疼痛モデルが確立され、行動学的ならびに免疫組織学的解析を行った報告が散見されるようになった。しかし電気生理学的解析に関する報告は少ない。

今回、我々は行動学的解析に加え痛覚伝達に重要な脊髄後角膠様質細胞での興奮性シナプス入力変化を解析したので報告する。

モデルは成熟マウスの左大腿骨髄腔内に腫瘍細胞 (NCTC2472) を注入して作製し、自発痛や荷重時痛による逃避行動に加え、足底への機械的刺激に対する閾値を正常マウスと比較した。また脊髄横断スライス標本でのパッチクランプ法による腰部脊髄後角表層細胞における興奮性シナプス後電流を記録・解析し比較した。

モデルでは疼痛逃避行動に加え、足底での痛覚過敏を認めた。また脊髄後角膠様質細胞へのシナプス応答で自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅の増大を認めた。

免疫組織学的に本モデルは末梢神経損傷モデルとの類似点が報告されている。一方、末梢神経損傷モデルは脊髄後角において中枢性知覚過敏を来すと報告されている。

したがって、本モデルでは病巣部位からの自発性の疼痛発現に加え、脊髄表層における興奮性シナプス応答の増大による中枢性知覚過敏が生じ、病巣部位外での痛覚過敏を生じていると考察された。

A13. セロトニンを介した脊髄痛覚シナプス伝達抑制の可塑的变化—in vivo パッチクランプ法を用いた解析—

古江秀昌, 吉村 恵 (九州大学大学院医学研究院統合生理学分野)

ウレタン麻酔下のラット脊髄後角表層の膠様質細胞から生理的感覚刺激によって誘起される興奮性シナプス応答を記録・解析し、セロトニンのシナプス前性の抑制作用を正常および神経因性疼痛モデルラットで比較・検討した。正常ラット後肢皮膚へ機械的痛みおよび触刺激を加えると、電位固定下に興奮性シナプス後電流 (EPSC) の発生頻度と振幅が著明に増大した。これらの応答の振幅は脊髄へ投与したセロトニンによって共に抑制され、機械的痛みの応答は主に 5HT_{1A}、触応答は 5HT_{1B}あるいは 5HT_{1D}の作動薬によりそれぞれ著明に抑制された。神経因性疼痛モデルでは、触応答に対する機械的痛み応答の振幅の比が、正常から得られたものより有意に増加した。また、5HT_{1A}を介した機械的痛みの抑制が選択的に消失した。以上より、神経因性疼痛モデルでは 5HT_{1A}を介する下行性セロトニン抑制能の減弱によって、機械的痛みの興奮性シナプス伝達が増大し、痛覚過敏が生じる事が示唆された。

A14. イソアワモチの光に直接応答する神経細胞の新しい光感覚機能について

後藤 司, 下津京子 (鹿児島大学大学院・医歯学総合研究科・神経病学講座・神経解剖学分野)

海産軟体動物イソアワモチの神経節には光感受性の神経細胞がいくつか存在する。これらの細胞は普通の眼の視細胞 (光受容器細胞) に特徴的な繊毛とか微絨毛構造が欠けているために、単純光受容器細胞 (Simple photoreceptors/SPRs) と呼ばれる。それら一次の光感覚細胞、SPRs は数分から数時間に及ぶゆっくりとした光応答を示し、種々のシナプス入力を中継する二次性の介在ニューロンでもある。従って、SPRs は最近登場した哺乳類の光感受性の神経細胞、ipRGCs に良く似ている。

SPRs のうち、過分極性の光応答する Ip-1/Ip-2 細胞は上述通り介在ニューロンであるが、同時に呼吸口の閉閉を支配する運動ニューロンでもあることが示唆された。また、水陸両生のイソアワモチは体表面からの水圧または接触刺激、即ち持続的な抑制性の入力が干潮で解除されるとエラ呼吸から肺呼吸に移るために呼吸口が開くことが示唆された。従って、肺呼吸は Ip-1/Ip-2 が互いに同期して発火することで誘発し、持続的な抑制性のシナプス入力・伝達によって制御されることが考えられた。最終的に、Ip-1 と Ip-2 細胞は、新しい光感覚機能として、明かりの下、たとえ閾値下の照明であっても、抑制性のシナプス伝達そしてそれ

に続く呼吸運動が LTP のように長期に増強する役割を演じていることが考えられた。

A15. 顔認知と大脳誘発電位時空間分析

村山伸樹, 原 正志, 伊賀崎彦彦 (熊本大学大学院自然科学研究科)

本研究では、ヒトに顔画像および文字画像を与え、その際に得られた大脳誘発電位に対して電流源密度法を適用して両刺激画像に対する脳内情報処理を比較検討した。対象は健常者 8 名で、被験者はディスプレイの前約 1m の椅子に座り、ディスプレイに現れる刺激画像を見るよう指示された。記録は 10-20 電極法に従って記録し、基準電極は両耳朶連結とした。刺激は「顔」画像と顔画像をモザイクにした「モザイク」画像をそれぞれ呈示頻度 50% でランダムに呈示した。画像呈示時間は 1 秒、呈示間隔は 1.5 秒、加算回数は 500 回とした。文字画像についても同様な条件で実験を行なった。顔刺激—ランダム画像刺激によって得られた誘発電位から電流密度差を計算して頭皮上マップを作成した。その結果、顔画像刺激では刺激後 136ms に右外側後頭部に反応が出現し、180ms に左外側後頭部にも反応が現れ、その後、この反応はやや内側部に移動し、220ms から 300ms の間、外側後頭部と後頭部間で反応が互いに連結するように振動していた。一方、文字画像刺激では、刺激後 178ms に同時に両側外側後頭部に反応が現れ、やや右側優位な反応であった。この反応は 230ms で消失した。このことから、顔画像の認知の脳内情報処理は、簡単な文字の情報処理に比較して複雑な処理を行なっていることが示唆された。

A16. ラットバゾプレッシン産生ニューロンにおける酸感受性について

大淵豊明¹, 横山 徹¹, 斎藤 健², 鈴木秀明³, 上田陽一¹ (¹産業医科大学・医・第 1 生理学, ²産業医科大学・医・脳神経外科学, ³産業医科大学・医・耳鼻咽喉科学)

【目的】酸感受性イオンチャンネル (Acid-sensing ion channels: ASICs) は、細胞外プロトンにより活性化される Amiloride 感受性電位非依存性カチオンチャンネルであり、これまでに 7 種のアイソフォーム (ASIC1a, 1b, 1b2, 2a, 2b, 3, 4) が報告されている。今回我々はバゾプレッシン (AVP) 産生ニューロンにおける ASICs の発現の有無を検討した。【方法】実験には、AVP-eGFP トランスジェニックラットの視床下部視索上核を含む脳組織から単離したニューロンを用いた。培養後、蛍光顕微鏡下で AVP-eGFP 発現ニューロンを同定し、(1) ホールセルパッチクランプ法により、酸刺激を加えた場合の電気生理学的変化を記録

した。(2) 蛍光免疫組織化学的染色法により ASICs アイソフォームの発現の有無を調べた。【結果】(1) 酸刺激により Amiloride (200 μ M) で抑制される電位非依存性の内向き電流が観察された。この電流は, PcTX-1 (100nM) および Salicyrate (1mM) 存在下で変化がみられず, Zn²⁺ (300 μ M) 存在下で増強された。pH_{0.5} は 5.71 \pm 0.04 であった。(2) 抗 ASIC1 抗体および抗 ASIC2a 抗体に対し蛍光反応が見られた。【考察】AVP 産生ニューロンに ASICs の存在が示唆された。

A17. ラット視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへのシナプス入力における TRPA1 の役割: 電気生理学的検討
横山 徹, 大淵豊明, 藤原広明, 長友敏寿, 上田陽一 (産業医科大学・医学部・第1生理学)

【目的】TRPV1 の変異型がバゾプレッシン産生神経分泌ニューロンの細胞体に存在し, 浸透圧感受性およびバゾプレッシン分泌調節に関与していることが報告されているが, 最近, 痛みセンサーとして注目されている TRPA1 にも浸透圧感受性があることが報告された。今回我々は, ラット視索上核大細胞性神経分泌ニューロンへのシナプス入力における TRPA1 の役割について電気生理学的検討を行った。【方法】ラット脳スライス標本を作製し, 視索上核の大細胞性神経分泌ニューロンからパッチクランプ法により興奮性シナプス後電流 (EPSCs) および抑制性シナプス後電流 (IPSCs) を記録した。TRPA1 アゴニストである AITC (50 μ M) および Cinnamaldehyde (30 μ M) を投与し, EPSCs および IPSCs に対する効果を調べた。【結果】AITC および Cinnamaldehyde は, EPSCs の頻度を有意に増加させた。この効果は TRPA1 の作用をブロックする高濃度の Menthol (300 μ M) 前投与下では消失した。AITC および Cinnamaldehyde は IPSCs に影響を与えなかった。【考察】ラット視索上核の大細胞性神経分泌ニューロンへの興奮性シナプス入力に対して TRPA1 の活性化が促進的に働くことが示唆された。

A18. ラット副腎髄質細胞における Ca²⁺ の貯蔵に関する流入経路

井上真澄, 原田景太, 松岡秀忠, 藁科 彬 (産業医大・医・第2生理)

副腎髄質細胞において, Ca 貯蔵部位作動性 Ca 流入 (SOC) がカテコールアミン合成を促進することが示唆されている。しかし, 今まで Ca 貯蔵部の枯渇によりカチオンチャネルの活性が起こることを明瞭には観察されていない。そこでこの問題をラット副腎髄質 (AM) 細胞を用いて電気生理学的および細胞生物学的に検討した。小胞体 Ca

ポンプ抑制薬の投与は, AM 細胞において細胞内 Ca 濃度の上昇を誘発した。この Ca 濃度の上昇は, 2mM Ni²⁺ の細胞外投与により完全に抑制されたが, 100 μ M D600 では抑制されなかった。-60mV で記録した全細胞電流において, Ni²⁺ は見かけ上の外向き電流を誘発したが, D600 は全細胞電流に影響を与えなかった。小胞体 Ca ポンプの抑制は, 静止時の全細胞電流や Ni²⁺ 誘発性外向き電流にはまったく影響を及ぼさなかった。さらにカフェインによる細胞内 Ca 動員は, 1mM Ni²⁺ 存在下では有意に抑制された。SOC チャネルの分子実体と考えられている TRPC チャネルの発現に関して, RT-PCR では TRPC1 と TRPC5 の mRNA の存在が確認された。TRPC1 様免疫反応物の大部分は小胞体に局在し, 細胞膜には局在していなかった。小胞体 Ca センサーである STIM1 は, 蛋白レベルでラット AM 細胞において発現していなかった。これらの結果は, ラット AM 細胞では SOC 機構がないことを示唆する。

A19. 前駆破骨細胞に発現する TRPV2 は Ca²⁺ オシレーションの構築分子として破骨細胞への分化を誘導する

岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 大城希美子, 根本哲臣, 岡部幸司 (福岡歯科大学・細胞分子生物学講座・細胞生理学分野)

【目的】破骨細胞分化において, 前駆破骨細胞に発生する Ca²⁺ オシレーションは重要な分化シグナルであるが, その発生機序は分かっていない。我々は, 前駆破骨細胞を分化因子 receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) で刺激すると TRPV2 の発現が上昇すること, 細胞内 Ca²⁺ オシレーションが発生することを報告した。今回は, TRPV2 の Ca²⁺ オシレーション形成への関与を調べた。【方法】前駆破骨細胞 (RAW264.7) を用いて, RANKL 刺激後の細胞内 Ca²⁺ 濃度とホールセル電流を測定した。【結果】RANKL 刺激により TRPV2 を発現した細胞では Ca²⁺ オシレーションと過分極下にて内向き陽イオン電流の周期的な活性化が認められた。しかし, 両者の発生頻度は RNAi 法により TRPV2 の発現を抑制すると低下した。また, TRPV2 発現細胞に発生する Ca²⁺ オシレーションと陽イオン電流は, TRPV 阻害剤 (ruthenium red) および PLC 阻害剤 (U73122) により共に抑制された。【考察】結果より, RANKL 刺激に依存して前駆破骨細胞に発現する TRPV2 は PLC を介して活性化され, 細胞外からの Ca²⁺ 流入経路として機能することが分かった。流入した Ca²⁺ は細胞内 Ca²⁺ 貯蔵部位から放出された Ca²⁺ と共に Ca²⁺ オシレーションを形成し, 破骨細胞分化を誘導すると考えられた。

A20. 心筋カルシウムシグナリングにおける Na/Ca ex-

changer と PMCA の相互作用

塩谷孝夫, 穎原嗣尚 (佐賀大・医・生体構造機能学)

マウス心筋細胞から Na/Ca 交換電流 (I_{NaCa}) を記録した。 I_{NaCa} は, リアノジン・タブシガルジンの存在下で, ランプパルスによって誘発した。1) 細胞膜カルシウムポンプ (PMCA) の阻害薬であるバナジン酸 (VO_3^{3-}) を細胞内に投与すると, I_{NaCa} の電流振幅は濃度依存的に増大した (対照: 1.05 ± 0.11 , 2mM 投与時: 2.21 ± 0.21 A/F)。2) バナジン酸と作用機序の異なる PMCA 阻害薬 5 (6) -カルボキシエオシンの細胞内投与も, 同様に I_{NaCa} の振幅を増大させた (対照: 1.11 ± 0.10 , 20 μ M 投与時: 1.75 ± 0.14 A/F)。3) バナジン酸 (2mM) 投与時の I_{NaCa} の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 依存性は, 低濃度側へとシフトしていた (対照: $EC_{50} = 0.97\mu$ M, 2mM 投与時: 0.40μ M)。これらの結果から, マウス心筋 PMCA の阻害が, 細胞膜近傍の $[Ca^{2+}]_i$ レベルの上昇を介して, Na/Ca exchanger を活性化することが示された。この PMCA と Na/Ca exchanger の相互作用は生理的条件においても機能すると考えられ, 心筋カルシウムシグナリングへの強い関与が考えられた。

A21. 血漿レプチンの脳脊髄液移行におけるコレシストキニン (CCK) の役割

砂川昌範, 本村 真, 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)

レプチン抵抗性の発現に対するコレシストキニン (CCK) の作用を解明するために血漿レプチンの脳脊髄液移行における CCK の影響を検討した。24 時間絶食後, OLETF および LETO ラットの皮下に Devazepide (CCK₁ 受容体拮抗薬, 0.3mg/kg), LY 225910 (CCK₂ 受容体拮抗薬, 1mg/kg) 及び CCK-8 (10 μ g/kg) を投与し, 対照として生理食塩水を投与した。30 分後に組換えラットレプチン (100 g/kg) を腹腔内に投与した。レプチン投与 2.5 時間後に静脈採血と脳脊髄液の採取を行った。血漿および脳脊髄液のレプチン濃度を ELISA 法により測定し, その濃度比を血漿レプチンの脳脊髄液移行能 (PTC) として評価した。OLETF ラット脳脊髄液中レプチン濃度は LETO ラットのそれに比して有意に低下していた。OLETF ラットの PTC は Devazepide 投与により減少傾向を示し, CCK-8 投与により有意に増加したが, LY 225910 投与による変化はみられなかった。OLETF ラットにおいて, CCK₁ 受容体拮抗薬による PTC の減少, CCK-8 による増加がみられたことより, OLETF ラットでは CCK が CCK₁ 類似受容体を介して血漿レプチンの脳脊髄液移行を調節している可能性が示された。

A22. Ca_v2 チャネル IQ ドメインとカルモジュリンの構造と機能

森 誠之^{1,3}, C.W. VanderKooi², D.J. Leahy², D.T. Yue³
(¹福岡大学医生理学, ²Department of Biophysics, School of Med., Johns Hopkins Univ, ³Department of Biomedical Engineering, School of Med., Johns Hopkins Univ)

神経シナプス終末における電位依存性 Ca チャネルは伝達物質の放出を促進することで, 様々な神経や筋細胞の興奮パターンに急速な影響を与える。特に, P/Q 型 (Cav2.x) カルシウムチャネルに見られるポジティブフィードバック制御, Ca²⁺-dependent facilitation (CDF) は活性化頻度の上昇に伴い, カルシウム流入を増強させる。この CDF は, シナプス後膜電位のパターン変化に大きな寄与をもたらすものと考えられている。そこで, 本研究は CDF の分子基盤を構造学的観点から明らかにすることを目的として, 1) Cav2 チャネルの IQ ドメインと Ca²⁺ 仲介分子, カルモジュリン (CaM) の結晶複合体構造解析を行い, 2) システム的アラニンスキャニングと分子シミュレーションから構造機能連関を明らかにした。これらの結果, IQ モチーフの上流域に重要な結合部位が存在すること, CaM の両端にある Lobe (房) ドメインの N-lobe は結合, C-lobe は解離することで CDF の制御に関与することなどが新たに示唆された。

A23. Calcium- and concentration-dependent effects of calmodulin and its mutants on Cav1.2 Ca²⁺ channels in guinea pig ventricular myocytes

F. Guo^{1,3}, E. Minobe¹, K. Yazawa¹, H. Asmara¹, D-Y. Han², L-Y. Hao³, M. Kameyama¹ (¹Dept Physiol, Grad Sch Med & Dentl Sci, Kagoshima Univ, ²Dept Pharmacol, ³Dept Pharmac Toxicol, Sch Pharmac Sci, China Med Univ, China)

Ca²⁺/calmodulin (CaM) -dependent modulation of L-type Ca²⁺ channel is vital for many biological functions. Although Ca²⁺ bindings to the C-terminal lobe (C-lobe) and N-terminal lobe (N-lobe) of CaM have been suggested to induce distinct channel modulations, the underlying mechanisms are yet unclear. In this study, we investigated the concentration- and Ca²⁺-dependent effects of CaM mutants, CaM₁₂ and CaM₃₄, in which Ca²⁺ binding to N- and C-lobe was eliminated respectively, on activity of the Cav1.2 Ca²⁺ channels by inside-out patch-clamp technique in guinea pig ventricular myocytes. CaM₁₂ and CaM₃₄ (0.7-10 μ M) were applied with 3 mM ATP, and the both produced channel activity in inside-out patches. Concentration-activity curves were bell-shaped, similar to that for wild-

type CaM. However, unlike wild-type CaM, there was no obvious leftward shift of the curves by increasing $[Ca^{2+}]$, suggesting that Ca^{2+} binding to the both lobes was necessary for the Ca^{2+} -dependent shift. These results suggest that both N-lobe and C-lobe contribute to Ca^{2+} -dependent facilitation and inactivation of the Cav1.2 Ca^{2+} channel.

A24. 単ーグリシン作動性神経終末部にみられる高閾値 Ca チャネルの分布

野中喜久^{1,2}, 前田 恵^{2,3}, 山鹿敏臣², 田中永一郎³, 村山伸樹¹ (¹熊本大学大学院自然科学研究科, ²熊本保健科学大学生理, ³久留米大学大学院医学研究科脳・神経機能部門)

海馬 CA1 細胞に投射する微小 GABA 作動性神経終末部に持続型高閾値 (HVA) Ca^{2+} チャネルが存在し, GABA の遊離に関与していることを先に明らかにした (Mura-kami ら, 2002). 今回は脊髄グリシン (Gly) 作動性微小神経終末部 ($\phi < 1\mu m$) からのグリシン遊離に機能している Ca^{2+} チャネルのサブタイプについて検討した. Gly 作動性神経終末が多数付着した脊髄背側交連核 (SDCN) ニューロンを機械的に単離して, その 'シナプス・ブートン標本' を作製した. SDCN ニューロンに入力する単ー Gly 作動性神経終末部を選択的に焦点電気刺激 (15-20 μA , 0.2Hz, 持続時間 100 μsec) し, シナプス後膜側にあたる SDCN ニューロンよりホールセルパッチ法にて抑制性グリシン作動性シナプス後電流 (eIPSC) を記録した. これを指標に種々の選択性の高い Ca^{2+} チャネル拮抗薬を作用させ, 本神経終末部に存在する HVA Ca^{2+} チャネルサブタイプの分布と機能を明らかにした. その結果, ① SDCN ニューロンに投射する Gly 作動性神経終末部には 4 種類の高閾値 Ca^{2+} チャネル (L, N, P, R 型) が存在して Gly の遊離に関与するが, Q と T 型は少ないかない. ② P と R 型は eIPSC の 2 成分すなわち電流振幅と発現成功率 (R_{suc}) を最も強く抑制し, これらはほとんどの終末部に存在する. 他方, L と N 型は使用した終末部の約半数に存在し, eIPSC の 2 成分への抑制作用は弱い. 以上のことから, P と R 型は終末部の release site (Wu ら, 1999) に存在し, L と N 型は release site の近傍と遠くに, Q と T 型は release site より遠くにのみ, あるいは存在しないと思われる.

A25. 内向き整流 K^+ 電流の細胞内 Mg^{2+} およびスベルミンによるブロックと心筋再分極予備力: シミュレーションによる定量的検討

石原圭子 (佐賀大学・医・生体構造機能学・器官細胞生理)

心筋内向き整流 K^+ 電流 (I_{K1}) は多くの心筋細胞モデルにおいて時間非依存性電流として記載され, 定常状態の電流電圧関係を再現する実験式が組み込まれている. 我々は Kir2.1 モデル (Yan & Ishihara, J Physiol, 2005) を基に I_{K1} のブロックによるダイナミクスを再現するモデルを作成し, 包括的心筋細胞モデル (Kyoto model: Takeuchi et al, J Gen Physiol, 2006) に組み入れ, I_{K1} をブロックする細胞内の遊離スベルミンと Mg^{2+} の濃度の変化が, I_{K1} の変化を通して心室再分極に及ぼす影響を検討した. その結果, 再分極初期相で Mg^{2+} ブロックの解放により一過性成分 (I_{K1} Transient) が流れ, スベルミン/ Mg^{2+} 濃度の増加や Mg^{2+} 濃度の減少は I_{K1} transient を減少させて活動電位持続時間を延長させることが示された. さらに I_{K1} transient と急速活性型遅延整流性電流 (I_{Kr}) の両電流が減少すると早期後脱分極が発生した. I_{K1} transient は I_{Kr} 減少の際に重要な再分極予備力 (repolarization reserve) として働き, スベルミン/ Mg^{2+} 濃度の異常は I_{Kr} 減少による薬剤性 (後天性) QT 延長症候群における Torsade de pointes 発生の危険因子である可能性が示唆された.

A26. カエル坐骨神経の複合活動電位に及ぼすカプサイシンとその関連物質の抑制効果

友廣大輔, 水田恒太郎, 藤田亜美, 柳 涛, 岳 海源, 朴 蓮花, 青山貴博, 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))

カプサイシンは唐辛子に含まれる辛味成分であり, 1 次感覚ニューロンの末梢端に存在する TRPV1 を活性化して熱や痛みの感覚を引き起こす. 一方, カプサイシンクリームは皮膚への塗布により痛みを取り除くことができる. この作用機序としてクリームを塗った部位の近傍でカプサイシンが 1 次感覚ニューロンの末梢端に存在する TRPV1 を活性化し, その神経端が萎縮することなどが考えられている. また, カプサイシンによる電位依存性 Na^+ チャネルの抑制が報告されており, その作用機序として, 細胞膜の脂質層の弾性変化やカプサイシン自身による Na^+ チャネル抑制などが考えられているが詳細は不明である. 今回, カエル坐骨神経に air gap 法を適用して複合活動電位 (CAP) を記録し, カプサイシンやその関連物質が CAP に及ぼす作用を調べた. その結果, カプサイシンは TRPV1 の活性化を介さずに CAP を抑制し, バニリル基のベンゼン環に結合している置換基が CAP 抑制の大きさに関係していることが明らかになった. つまり, バニリル基に極性の残基が存在している物質では CAP 抑制が小さくなる一方, バニリル基に結合している疎水性残基の長さや CAP 抑制の大きさの間には相関がなかった. 以上より, カプサイシンは

細胞膜の脂質層ではなくイオンチャンネルに直接作用してCAPを抑制することが示唆される。これはカプサイシンクリーム鎮痛に寄与するかもしれない。

A27. 興奮性および抑制性シナプス前終末におけるサノリ毒 (STX) の効果

赤池弘成^{1,2}, 久保千春¹, 申 敏哲², 伊東祐之² (九州大学大学院医学系学府心身医学,²熊本保健科学大学生命科学研究部門)

以前よりSTXはNaチャンネルの構造と機能を研究するのに役に立つことが知られている。今回、幼弱ラットから単離した脊髄背側交連核 (SDCN) ニューロンに注射する興奮性および抑制性シナプス前終末からのグルタミン酸 (Glu) およびグリシン (Gly) の自発性遊離と活動電位依存性遊離に対するSTXの効果を検討した。

神経終末が多数付着したSDCNニューロンを機械的に単離して、その‘シナプス・ブートン標本’を作製した。SDCNニューロンよりホールセルパッチ法にて興奮性Gluおよび抑制性Gly作動性シナプス後電流 (sEPSCとsIPSC) を記録した。また、SDCNニューロンに入力する単一GluまたはGly作動性神経終末部を選択的に焦点電気刺激 (0.2Hz, 持続時間100μsec) し、シナプス後膜側にあたるSDCNニューロンよりホールセルパッチ法にて興奮性Gluおよび抑制性Gly作動性シナプス後電流 (eEPSCとeIPSC) を記録した。なおこの際、シナプス下膜のNaチャンネルへのSTXの作用を阻害するため、QX-314を後膜ニューロン中に投与して行った。

STXは電流振幅に影響を及ぼすことなく、sEPSCとsIPSCの発現頻度を明らかに増加させ、その効果はsEPSCよりもsIPSCにおいてより大きかった。またeEPSCとeIPSCの電流振幅と発現成功率 (R_{suc}) を増加させたが、これはSTXがシナプス前終末に作用を及ぼし、GluやGlyの放出を促進させることを示唆した。さらにSTXはシナプス後膜よりも前終末において、より低濃度で作用することが明らかになった。

A28. ラット脊髄後角膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達に対するレニフェラトキシンの作用

蔣 昌宇, 藤田亜美, 柳 涛, 岳 海源, 朴 蓮花, 水田恒太郎, 友廣大輔, 青山貴博, 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))

レニフェラトキシン (RTX) はカプサイシンに比べ1000倍以上TRPV1に高親和性の植物アルカロイドである。成熟ラット脊髄薄切片の膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、自発性興奮性シナプス伝達に対する

RTXの作用を調べた。RTXは自発性EPSCの振幅を変えずに発生頻度を増加させた。また、調べたニューロンの約半分で内向き膜電流を誘起した。これらの作用はNa⁺チャンネル阻害薬テトロドトキシンにより影響を受けない一方、TRPV1阻害薬カプサゼピン存在下で見られなかった。RTX作用は0.5~2分の範囲で投与時間に依存せず、2時間間隔の繰り返し投与ではRTXは作用しなかった。またRTX作用は濃度と共に大きくなったが、高濃度では逆に小さくなった。カプサイシンはRTXと同様な作用を示し、これらの作用は互いに閉塞した。一方、RTXと同様に自発性興奮性シナプス伝達の促進を示すTRPA1作動薬の作用とは閉塞しなかった。以上より、RTXはTRPA1と無関係にTRPV1を活性化し、神経終末から起こる自発性グルタミン酸放出の促進と膜の脱分極を誘起することが明らかになった。これらの作用はRTX投与開始後直ぐに脱感作する一方、長時間、脱感作から回復しなかった。このような結果は、RTXを治療薬、また、脊髄後角におけるTRPV1の生理的役割を知るツールとして使用する際に役立つことが期待される。

A29. ラット海馬スライスにおけるβ振動とてんかん様発火

西村基志, 夏目季代久 (九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻)

ヒト脳内海馬では、記憶学習に関わっているθ波、β波、γ波等の脳波、また、記憶が阻害されると言われているてんかん波が観察される。しかし、それらの波の何が異なり記憶活動への影響が異なるのか明らかにされていない。そこで本研究ではラット海馬スライスにおいて観察されるカルバコール (アセチルコリン受容体賦活薬) 誘導β振動とgabazine (GABA_A受容体阻害薬) 誘導てんかん様発火を用いて、それらの波の違いを調べた。

スライスの切断実験の結果によると、CA3のみのスライスでは両波とも観察されたが、CA1のみのスライスでは、てんかん様発火は誘導されたがβ振動は誘導されなかった。また、NMDA受容体阻害薬APVを両波に投与した所、CA1てんかん様発火では周波数が減少したが、CA3てんかん様発火とβ振動には影響を与えなかった。また、AMPA受容体阻害薬CNQX、ギャップ結合阻害薬carbenoxoloneを投与すると両波共に消失した。

以上の結果より、てんかん様発火、β振動は異なる発生源を持っている事が分かり、また、その誘導に異なる受容体が関わるものと予想される。β波ではCA3からCA1へβ波が伝搬しCA1錐体細胞は内嗅領皮質からの情報も処理可能と考えられ、記憶や学習に関わる事が出来る一方で、

てんかん波では CA1 神経回路が発生源になり記憶活動の妨げとなる、と示唆される。

A30. Protein Transduction therapy を用いた新規 siRNA 導入システムの開発

道上宏之¹、黒住和彦¹、市川智継¹、S. Dowdy³、伊達敷¹、松井秀樹²、富澤一仁^{2,4} (¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科脳神経外科、²同 細胞生理学、³カリフォルニア大学サンディエゴ校 (UCSD) 医学部細胞分子医学、⁴熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学)

RNA 干渉は、2 本鎖 RNA により配列特異的に mRNA が分解される現象であり、21-23 塩基対の 2 本鎖 RNA (siRNA) を用いることで哺乳動物にも適用可能であることが明らかにされている。今回我々は、Protein Transduction System を用いた新しい siRNA 導入法を確立し、その腫瘍抑制効果について検討した。脳腫瘍に発現している 2 種類の標的遺伝子の siRNA を用いて発現抑制することにより、腫瘍増殖を抑制する効果があることを *in vitro* および *in vivo* で確認した。

A31. 各種ラット培養血管平滑筋細胞の細胞増殖における細胞内 cAMP 濃度および protein kinase A (PKA) 活性の関与

木村安貴、砂川昌範、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)

OLETF および LETO ラット大動脈由来培養血管平滑筋細胞 (OL-VSM, LE-VSM) および A7r5 の 3 種類の平滑筋細胞 (VSM) の細胞増殖を WST-1 を用いた生細胞数算定により測定し、増殖曲線を作成した。細胞内 cAMP 濃度を化学発光 ELISA 法により測定し、PKA 活性を PKA Peptide Substrate のリン酸化を指標に測定した。増殖率は OL-VSM, LE-VSM, A7r5 の順に高かった。増殖率を一致させた条件下で cAMP 濃度および PKA 活性を測定した結果、cAMP 濃度は $1.7 \pm 0.2 \text{ pmol/well}$ (OL-VSM), $1.3 \pm 0.1 \text{ pmol/well}$ (LE-VSM), $1.7 \pm 0.1 \text{ pmol/well}$ (A7r5) であり、PKA 活性は $4.6 \pm 2.3 \text{ ng/}\mu\text{l}$ (OL-VSM), $5.8 \pm 3.1 \text{ ng/}\mu\text{l}$ (LE-VSM), $31.3 \pm 6.0 \text{ ng/}\mu\text{l}$ (A7r5) であった。PDGF 刺激下で db-cAMP (0.3mM) を各種細胞に 48 時間暴露すると、各種細胞の細胞増殖は有意に抑制されたが、各種細胞の PKA 活性に差は認められなかった。増殖率を一致させた条件下においては、各種細胞間で PKA 活性に相違がみられたことにより、無刺激下の VSM の増殖には細胞内 cAMP 濃度及び PKA 活性以外の因子の関与が示唆された。一方、db-cAMP は PKA 以外の経路を介して PDGF 誘導の VSM 増殖を抑制するのが示唆された。

A32. 種々の pp60^{src} 活性を有するラット培養血管平滑筋細胞の確立

襲 猛、砂川昌範、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)

平滑筋細胞内 pp60^{src} 活性の異なる細胞を確立するために、mouse *src* cDNA/pUSE プラスミドを用いて ²⁹⁶Lys→Arg と ⁵²⁸Tyr→Phe の 2 箇所を置換した dominant negative (dn) *src* cDNA/pUSE および ⁵²⁸Tyr→Phe のみを置換した dominant positive (dp) *src* cDNA/pUSE を作製した。これらの各種プラスミドをリポフェクション法により培養血管平滑筋細胞 A7r5 に導入し、48 時間経過後 G418 (1mg/ml) 添加培養液にて発現陽性細胞のみを選択し、安定形質発現細胞を確立した。確立した細胞内 pp60^{src} 活性を抗 pp60^{src} リン酸化抗体 (anti-phospho-⁴¹⁶Tyr pp60^{src}, anti-phospho-⁵²⁹Tyr pp60^{src}) を用いたウエスタンブロット法により評価した。Src 蛋白発現量は A7r5, (-)/pUSE 発現 A7r5, *src*/pUSE 発現 A7r5, dn *src*/pUSE 発現 A7r5 および dp *src*/pUSE 発現 A7r5 間で有意な差はみられなかった。また、活性化 Src 量も各種細胞間で有意な差はみられなかった。pUSE プラスミドのサイトメガロウイルス由来 CMV プロモーター活性による遺伝子発現が促進されないことから、A7r5 細胞内には CMV プロモーター活性を抑制する因子が存在する可能性が示唆された。

A33. Bound-thrombin 刺激後の血管内皮細胞膜上 TRAP の動態

中村真理子、砂川昌範、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〕 Bound-thrombin (B-th) はラット大動脈由来内皮細胞 (RAECs) 膜上のトロンビンレセプター (TR) に作用するのをこれまでに報告した。一方、TR にトロンビン作用後に生じる TRAP は、その後の細胞内情報伝達に重要な役割を演じていると予想される。しかしながら、B-th 刺激後 TR から遊離された TRAP が細胞内外のいずれに存在するかは明らかにされていない。そこで、B-th 刺激後、RAECs 膜上の TR から遊離した TRAP の動態・分布を明らかにするために、TR の N 末端 TRAP 部位を含む 14 残基のアミノ酸を認識する抗体 (ATAP2) を用いて、B-th 刺激後の細胞膜上 TRAP の分布を追究した。〔方法〕 RAECs の非刺激、B-th 刺激、Argatroban で活性を抑制された B-th 刺激および Argatroban 単独刺激における、内皮細胞膜上 TRAP 部位を ATAP2 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。次に、RAECs 膜上 TRAP の分布、動態をタンデムスキャナー共焦点レーザー顕微鏡で解析した。〔結果〕 B-th 刺激後、RAECs 膜上 TRAP は消失していた。しかしな

がら、細胞間の接触部位にはわずかに TRAP が残存していた。一方、Argatroban で活性抑制された B-th 刺激後では RAECs 膜上に TRAP は多く分布していた。さらに、Argatroban 単独刺激後では、膜上の TRAP 部位は非刺激時と同様に多く存在していた。〔考察〕B-th の TR への作用により形成された TRAP は、細胞膜表面に存在していなかった事から、遊離された TRAP は細胞内へ移行した可能性が示唆された。

A34. ヒト子宮内膜間質細胞における TRP 蛋白質の発現と機能の探索

瓦林靖広, 海 琳, 本田 啓, 波多江純眞, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

(背景・目的) 間質細胞は筋線維芽細胞の一種であり、性ホルモン (E2, P4) や炎症性サイトカイン (TNF α) などの刺激によって形質転換する。その形態変化は、受精卵の着床、子宮内膜の脱落膜化による妊娠の維持などと深くかかわっていることが知られているが、どのような細胞機序によって、生じるのかについては殆ど知られていない。本研究では、最近、受容体刺激を含む種々の物理化学刺激によって活性化され、細胞の増殖や形質転換に関わっていることが明らかとなってきた TRP 蛋白質スーパーファミリーに着目し、Ca²⁺動態の変化を介した間質細胞の形質転換機序を探索した。(方法) 成人女性から採取した子宮内膜標本を酵素処理し単離した間質細胞を一次培養して用いた。RT-PCR 法, real-time PCR 法, ウェスタンブロット法で mRNA, 蛋白質の発現を検討した。更に, fura-2 によるデジタル蛍光イメージング法で細胞内 Ca²⁺動態を観察した。(結果) RT-PCR 法で 9 種の TRP アイソフォーム (C1, C4, C6, V2-V4, M3, M4, M7) の発現が確認された。子宮内膜の脱落膜化を促進する E2/P4 で約 2 週間処置すると, TRPC1, TRPC4 の発現増加がみられた。これに伴って, 間質細胞は敷石状形態を示し, 脱落膜化マーカー IGFBP1, プロラクチンの著明な発現増加がみられた。この時 TNF α を 24h 添加するとこれらの蛋白質遺伝子の発現減少が観察された。E2/P4 処置は, basal Ca²⁺流入, ストア枯渇活性化 Ca²⁺流入を数倍に増加させた。(結論) 間質細胞の TRPC1, C4 蛋白質は性ホルモンによる脱落膜化時にその発現が増加し, 細胞内に流入する Ca²⁺量を増加させていることが示唆された。

A35. 胎児大動脈由来平滑筋細胞 A7r5 の TRPC6 様電流の PKG を介した抑制機構

井上隆司, 菅 忠, 瓦林靖広, 森 誠之, 海 琳, 本田 啓 (福岡大学医学部生理学)

最近の我々の研究から心血管系に優勢に発現している受容体作動性 TRPC6 陽イオンチャネルは, NO/cGMP/protein kinase G (PKG) 系を介した負の制御を受けていることが明らかになった。本研究では, 同様の制御機構が血管平滑筋のモデル細胞である A7r5 においても同様の役割を果たしているか否かについて検討した。電位固定した A7r5 細胞に noradrenaline, Arg⁸-vasopressin (AVP) などの血管収縮性アゴニストを投与すると, 持続的なノイズ増加を伴う内向き陽イオン電流が活性化された。この電流は, 0mV 付近に逆転電位を持つ 'S' 字型の電流電圧関係を示し, siRNA 法によって TRPC6 蛋白質の発現を特異的に抑制すると消失することから, TRPC6 を必須の構成因子とする受容体活性化チャネルであることが分かった。一酸化窒素 (NO) 供与体 SNAP (100 μ M) や膜透過型 cGMP アナログで 8-bromo-cGMP (100 μ M) はこの電流を約 60% 抑制し, この効果は PKG 阻害薬 DT-3 (1 μ M) 前処置によってほぼ完全に消失した。同様に, AVP による A7r5 細胞の脱分極やそれに伴う 2 価イオンの流入も SNAP の前処置によって有意に抑制された。一方, 上記電流の発生への部分的な関与が示唆されている TRPC7 蛋白質を強制発現して得られた電流は, NO 供与体によってむしろ増強された。以上より, 血管平滑筋細胞膜の受容体刺激による Ca²⁺流入は PKG による負の制御を受けていることが強く示唆された。更にその抑制の程度は, TRPC6/TRPC7 発現の比率によって変化する可能性が示唆された。

A36. 気質と前頭葉の反応性の関連における母親と未経産女性の相違: 近赤外線分光法を用いた検討

池田英二, 西谷正太, 大森淳子, 木佐貴芳恵, 土居裕和, 篠原一之 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・神経機能学)

妊娠・出産を通して女性の脳機能が変化することが言われているが, 気質と脳活動の関連性の観点からみた報告はない。近年, 近赤外線分光法 (NIRS) など, 非侵襲的に脳血液量変化の測定を可能にする装置が開発され, また, 行動の触発・維持・抑制を含む 3 つの脳神経システムを仮定した「Cloninger の気質モデル」に基づく気質評価質問紙 (TCI) が注目されている。特に, このモデルの気質 3 項目は新規性追求がドパミン系, 損害回避がセロトニン系, 報酬依存がノルアドレナリン系と関係すると想定されている。そこで, 母親と未経産女性において, 前頭葉賦活課題への反応を NIRS で測定し, TCI の結果との関連性の相違から妊娠・出産による女性の脳機能の変化を検討した。前頭葉賦活課題には語流暢課題を用い, NIRS にて測定した課題中の脳血液量の変化と TCI の各項目のスコアとの関

係を分析した。その結果、未経産女性では右前頭前野の賦活度と報酬依存のスコアが有意な正相関を示したのに対して母親では同じ部位の賦活度が新規性追求のスコアと有意な正相関を示した。妊娠・出産によって右前頭前野の反応性がノルアドレナリンの影響下からドパミンの影響下に移行した可能性が示唆された。

A37. ヒト母親の母性行動に関与する神経基盤の解明：新生児の匂い検出課題を用いた検討

西谷正太, 桑本沙織, 高比良飛香, 篠原一之 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・神経機能学)

ヒト母親は乳児の表情(視覚)あるいは泣き声(聴覚)の提示によって前頭前野が賦活することが報告されており、ヒト母性行動には前頭前野が関与することが示唆されている。しかし、嗅覚を介する場合でも同様に母親の前頭前野の賦活がみられるかを調べた研究はなく、また、母親に特異的であるかを示した報告はない。一方、これまでに新生児の匂いに対する快・不快評価が調べられているが、母親は未経産女性よりも快評価が高いことが報告されている。そこで、本研究は新生児の匂いを用いた匂い検出課題を用いて、近赤外分光法(NIRS)により未経産女性と母親の前頭前野の活動を測定し、比較を行うことを目的とした。その結果、新生児匂い検出課題時における前頭前野の活動は、母親では未経産女性に比べ、有意な亢進が見られた。一方、比較課題として単語繰り返し課題、成人男性匂い検出課題を実施したが、これらに対する反応には有意な違いは見られなかった。したがって、他の感覚系を介する場合と同様に、嗅覚系を介しても母親では前頭前野の賦活が見られ、それは未経産女性では見られなかったことから、ヒト母性行動に前頭前野が関与する可能性が示唆された。

A38. フロン代替物質 1-ブロモプロパン吸入曝露による仔ラットへの影響

金丸 愛¹, 鶴岡朋子¹, 笛田由紀子², 石田尾 徹², 保利一², 粟生修司¹ (¹九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻, ²産業医科大学・産業保健学部・作業環境計測制御学)

1-ブロモプロパン(1-BP)を妊娠中の母ラットに曝露すると、仔ラットにおいて体重増加が抑制され、脳内臭素イオン(Br⁻)が蓄積される。これらが胎児期曝露によるものか、授乳によるものかを明らかにするため、曝露群と対照群の仔ラットを交換し生体影響を調べた。また、仔ラットの成長後の行動への影響を調べた。仔ラットの脳内 Br⁻ 濃度は、対照母ラットに授乳させた曝露群仔ラット(胎児期曝露群)では出生後減少していき、曝露母ラットに授乳させた対照

群仔ラット(授乳曝露群)では授乳と同時に増加し、その後減少していった。曝露群では出生後、一度低下した Br⁻ 濃度がその後増加し、また減少していった。生後の仔ラットの体重変化においては、胎児期曝露群と授乳曝露群では体重増加は抑制されなかった。したがって、体重増加の抑制には胎児期に引き続き、授乳期も曝露されることが要因となっていることがわかった。胎児期から授乳初期にかけて 1-BP に曝露された「曝露群」の仔ラットは、成長後にオープンフィールド試験と強制水泳試験において、対照群でみられた行動の性差が消失した。脳の性分化が起こっているとされる胎児期から妊娠初期に 1-BP に曝露されると、体重のセットポイントが変わり、情動および行動の性分化に関係する脳部位が影響を受けることが示唆された。

A39. 自発および誘発グルーミング時のラット前頭前野セロトニン・ドーパミン動態

塩田 昇, 成清公弥, 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高次脳機能講座粟生研究室)

グルーミングは哺乳類で広く認められ、i) 皮膚や毛皮の寄生虫や汚れを除去し清潔さの維持、ii) かゆみや痛みの抑制、iii) 唾液塗布による熱発散を介した体温調節など、セルフケア行動として多彩な身体維持機能を有しているが、その生理的意義や神経機構にはまだ不明の点が多い。ラットのグルーミングは大脳基底核ドーパミンや視床下部ペプチドで調節されていることが知られているが、高次脳への関与はよくわかっていない。本研究では、自発グルーミングと霧吹き噴霧による誘発グルーミングの行動特性を比較し、自発および誘発グルーミング時の前頭前野のセロトニンおよびドーパミンの動態をマイクロダイアリシス法で解析した。霧吹き誘発性グルーミングは時間経過および連続性において自発グルーミングと同様の性質を示したが、誘発グルーミングにおいてだけ前頭前野セロトニン濃度が有意に増加した。自発グルーミングでもセロトニンが増加したが、個体差が大きく有意の変化とはならなかった。ドーパミンは自発および誘発グルーミングどちらも変化しなかった。これらの結果は、自発グルーミングの発生には複数の要因が関与する可能性があるものの、霧吹き噴霧で誘発されるグルーミングは濡れた毛の調整というセルフケア行動であり、前頭前野セロトニンがその調節に関与していることを示唆する。

A40. 内因性摂食抑制物質 2-buten-4-olide が性別別・性行動に及ぼす影響

藤本智彦¹, 井上貴雄², 門田 誠¹, 粟生修司¹ (¹九州工業大学大学院・生命体工学研究科・脳情報専攻, ²長崎

大学大学院・医歯薬学総合研究科・医療科学専攻・生命医学講座・神経機能学分野)

2-buten-4-olide (2-B4O) は絶食 24 時間以降から血中に漸増していく内因性摂食抑制物質であり、自律神経機能や免疫機能へも影響を及ぼすことが主としてラットを用いた実験で明らかになっている。2-B4O は黄体形成ホルモン(LH)分泌を抑制することから生殖機能への影響も示唆されているが、その詳細はよく分かっていない。本研究では2-B4Oの生殖機能への影響を行動学的に評価することを目的とし、サル、サルの視覚的性弁別機能およびマウスの性行動に及ぼす影響を調べた。サル、サルの弁別課題では、雄ザルあるいは雌ザルの写真を1秒呈示し、その性別をレバー押しにより弁別させる課題を訓練した。食物・非食物の弁別課題も同時に訓練した。訓練終了後、サルに2-B4O(5mg/kg, i.m.)を投与すると、レバー押し潜時が延長し、性弁別の正答率が上昇した。食物弁別能には影響がなかった。マウスの性行動実験では、2-B4O投与(0.7mg/kg, i.s.)により、マウンティング開始潜時および単位時間当たりのマウンティング頻度には影響がなかったが、マウンティング開始から射精に至るまでの潜時が減少した。エネルギー環境の悪化を伝える2-B4Oには異性選択から交尾完了までの効率を上げる効果がある可能性がある。

A41. オキシトシンによる不安情動作用機構の解明

沖本直輝^{1,2}, 大森正泰¹, 西木禎一¹, 大守伊織¹, 平松祐司², 松井秀樹¹, 富澤一仁^{1,3} (1岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生理学, 2岡山大学大学院医歯薬学総合研究科産科婦人科学, 3熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学)

オキシトシン受容体は辺縁体、とくに扁桃体に豊富に存在し、近年オキシトシンに抗不安作用があることが分かってきたが、その分子機構についてはいまだ不明である。今回我々は、DNA マイクロアレイ法を行い、オキシトシン添加神経培養細胞ならびに授乳中の母親マウスの脳内でともに遺伝子発現が増強していたRGS2 (regulator of G-protein signaling 2)に注目し、オキシトシンとの関連について検討を行った。RGS2は近年不安を軽減させる効果を持つことが知られており注目されている。授乳中のマウスおよび、拘束ストレス負荷マウスではオキシトシンの分泌増加とともに扁桃体内のRGS2の発現が有意に増強した。またオキシトシン受容体アンタゴニストを扁桃体に投与すると拘束ストレス後RGS2の発現増強が見られないことも確認した。高架式十字迷路による行動学的解析では、RGS2の発現に比例して抗不安の傾向が見られた。さらに、オキシトシン受容体ノックアウトマウスでは拘束ストレス負荷後不安行動が強くなり、さらにRGS2の発現も野生株と比して著明に減弱していた。以上のことから、オキシトシンによる抗不安作用はRGS2を介して行われると強く示唆された。