

## 第 60 回西日本生理学会

日 時：平成 21 年 11 月 6 日, 7 日  
 場 所：福岡県歯科医師会館（福岡市天神）  
 当番幹事：福岡歯科大学・細胞分子生物学講座・細胞生理学分野 岡部幸司  
 参加者：100 名  
 演題数：40 題

第 60 回西日本生理学会は、福岡県歯科医師会館にて、100 名の参加者を経て、11 月 6 日（午後）と 7 日（午前）の二日間にわたり開催された。IUPS2009 京都開催の後ということもあり、応募演題数が少ないのではと懸念されたが、予想に反して 40 題もの演題が集まった。また、開催地が福岡市中心部の交通アクセスのよい場所であったためか参加者数も多く、各口演に対する質疑も活発に行われた。また、若手研究者を対象にした「日本生理学会九州奨励賞」には 8 題の応募があり、5 名の審査員によって研究内容、独創性、発展性、プレゼンテーション能力などを評価基準として厳正なる審査が行われた。その結果、九州大学大学院・歯学研究院・口腔機能解析学分野の安尾敏明氏「味蕾内における GABA の応答特性」と九州大学大学院・薬学研究院・病態生理学分野 別府薫氏「ミクログリアにおける AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 サブユニットの機能解明」の 2 題が受賞した。この賞が若手研究者の励みとなり、優秀な研究者の育成や西日本生理学会の活性化の一助となることを期待する。次期開催は長崎大学が当番校として長崎市で行われる予定である。総会において、医師薬学総合研究科医療科学専攻・生命医科学講座・神経機能学分野 篠原一之教授より当番校の代表として開催案内があった。

#### A1. ラットバゾプレッシン産生ニューロンにおける Large-conductance calcium activated potassium channels (BK チャネル) についての検討

大淵豊明<sup>1</sup>, 横山 徹<sup>1</sup>, 鈴木仁士<sup>1</sup>, 加藤明子<sup>1</sup>, 大坪広樹<sup>1</sup>, 藤原広明<sup>1</sup>, 鈴木秀明<sup>2</sup>, 上田陽一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産業医科大学・医・第 1 生理学, <sup>2</sup>産業医科大学・医・耳鼻咽喉科学)

【目的】BK チャネルは細胞内カルシウムにより活性化される K<sup>+</sup>チャネルで、これまでに 5 種のサブユニット ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1-4) 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 BK チャネルの生理機能およびサブユニット mRNA 発現について検討した。【方法】AVP-eGFP トランスジェニックラットの視索上核を含む脳組織を単離・培養したニューロンを用いた。蛍光顕微鏡下で AVP-eGFP 発現ニューロンを eGFP 蛍光を指標に同定し、(1) ホールセルパッチクランプ法により、神経伝達物質または BK チャネルモデレーターを投与した場合の電気生理学的変化、(2) multi-cell RT-PCR 法により BK チャネルサブユニットの mRNA の発現を調べた。【結果】(1) ニューロンの活動性はグルタミン酸投与により興奮し、GABA 投与により抑制された。活動電位の発火頻度は BK チャネ

ルアゴニストである NS1619 (100mM) 投与により減少し、BK チャネルアンタゴニストである IbTX (300nM) または ChTX (100nM) 投与により増加した。(2)  $\alpha$  サブユニット mRNA の発現がみられた。【考察】BK $\alpha$  チャネルは AVP 産生ニューロンの活動性調節に関与している可能性を示した。

#### A2. 味蕾細胞電位依存性ナトリウムチャネルの電気生理学的・分子生物学的研究

大坪義孝（九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報専攻）

味覚受容器である味蕾細胞は、味刺激により活動電位を発生し、味情報を味神経へ伝達する。甘味・苦味・旨味受容体を発現する細胞 (II 型) は、活動電位の発生によって効果的に電位依存性ヘミチャネルを開口させ、ATP を放出する。酸味受容体を発現する細胞 (III 型) の活動電位は電位依存性カルシウムチャネルの開口を促し、エキソサイトーシスによって伝達物質を放出する。本研究では、in-situ パッチクランプ法を用い、活動電位の上昇相を形成する電位依存性 Na 電流の電気生理学的特長を、RT-PCR 法により遺伝子発現を調べた。電気測定した細胞は、各細胞型に

対する抗体を用い免疫組織学的に同定した。多くの味蕾細胞の電位依存性ナトリウム電流は、 $1\mu\text{M}$  TTX で完全に抑制された。しかし、 $1\mu\text{M}$  TTX では抑制されない電流を持つ味蕾細胞もいた。活性化の電位 ( $V_{a1/2}$ ) および不活性化からの回復速度は味蕾細胞間で有意差があった。PCRの結果から、味蕾細胞は2種のTTX感受性サブタイプと1種のTTX非感受性サブタイプ ( $1\mu\text{M}$  TTX では抑制されない) に対する mRNA を発現することがわかった。味蕾細胞の不活性化からの回復速度は、同じ遺伝子を発現している神経細胞と比べ、著しく遅いことが分かった。味蕾細胞は高頻度の活動電位発生が困難なことから、持続的に味情報を伝達するためには、受容器電位の変動が必要と考えた。

### A3. 味蕾内における GABA の応答特性

安尾敏明, 吉田竜介, 堀尾奈央, 重村憲徳, 二ノ宮裕三 (九大・院歯・口腔機能)

近年、味細胞の一部には、神経伝達物質である  $\gamma$ アミノ酪酸 (GABA), その合成酵素 (GAD-67), トランスポーター (GAT), 受容体を発現することが報告された。また、GABA 投与により  $\text{Cl}^-$  電流が増加する細胞も存在することが示唆されている。これらは、GABA が味蕾内での情報伝達、特に細胞間コミュニケーションに関与する可能性を示唆する。しかし、その詳細はまだ全く不明である。

本研究では、GABA の味蕾内での作用を明らかにするため、RT-PCR 法を用いて、マウス味細胞における GAD-67,  $\text{GABA}_A$  受容体,  $\text{GABA}_B$  受容体サブユニットの発現様式を調べた。また、ルーズパッチ法を用いて味細胞の自発的な活動電位を記録し、GABA 投与後の変化を解析した。その結果、 $\text{GABA}_A$  受容体および  $\text{GABA}_B$  受容体サブユニットが検出された。GABA の投与により、発火頻度が増加する細胞と減少する細胞が存在した。さらに、RT-PCR の結果から GABA 応答を制御する2種類の  $\text{Cl}^-$  トランスポーター (KCC2, NKCC1) の発現が認められた。これらの結果は、GABA が味細胞の興奮性に何らかの影響を与えることを示唆する。しかし、その生理的意義明らかにするためにはさらなる研究が必要である。

### A4. PKC 活性に依存するラット心筋細胞 T 型 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの Subtype 変換

王 岩, 森島真幸, 賀来俊彦, 小野克重 (大分大学医学部病態生理学講座)

【背景】心筋細胞は分化・成熟に伴って T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの主要サブタイプが  $\text{Ca}_v3.2$  から  $\text{Ca}_v3.1$  に変換することが近年明らかにされたが、その機序や制御経路は不明である。【目的】分化による心筋細胞 T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの Sub-

type 変換に PKC 活性が関与するか否かを検討した。【方法】新生ラット心筋細胞を用いて、その T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル Subtype 発現量の時間依存的な変化を解析し、PKC 阻害剤の長期投与によるその変化に対する作用を検討した。【結果】新生ラット心筋細胞の自動拍動能とその  $\text{Ni}^{2+}$  感受性成分は出生後に次第に減少するが、その時間経過は PKC 活性化薬 (PMA) によって遅延され、PKC 阻害剤 (chelerythrine) によって促進された。また、T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの発現とその  $\text{Ni}^{2+}$  感受性成分、及び T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの isoform ( $\text{Ca}_v3.2$ ) は出生後に次第に低下するが、その時間経過は PMA によって遅延され、chelerythrine によって促進された。PKC 阻害剤 (3-IYIAP) は  $\text{Ca}_v3.2$ -T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの転写を制御する  $\text{Csx/Nkx2.5}$  の発現を抑制した。心筋細胞の PKC 活性は出生直後が最も高くその後次第に低下し、PKC 活性と  $\text{Ca}_v3.2$  mRNA の発現は正の相関を示した。よって出生後の T 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル  $\text{Ca}_v3.2$  isoform の減少は PKC 活性に依存する転写因子  $\text{Csx/Nkx2.5}$  の発現調節機構によって制御されている可能性が示唆された。

### A5. ミクログリアにおける AMPA 型グルタミン酸受容体 GluR2 サブユニットの機能解明

別府 薫, 小佐井有紀, 野田百美 (九州大学大学院薬学研究部病態生理学分野)

GluR2 サブユニットは AMPA 型グルタミン酸受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性を決定する重要な因子である。中枢神経系で免疫を司るミクログリアに発現する AMPA 受容体の機能的役割を検討するため、GluR2 欠損型および野生型マウスの初代培養ミクログリアを用いて、グルタミン酸誘発電流および炎症性マーカーを測定し比較検討を行った。GluR2 欠損型は野生型ミクログリアに対して AMPA 受容体の  $\text{Ca}^{2+}$  透過性が高く、炎症性サイトカイン放出量と iNOS 発現量の増加が見られた。また、細菌毒 (リポポリサッカライド; LPS) で活性化したミクログリアにおいて、野生型ではグルタミン酸誘発電流が時間依存的に減少したが、GluR2 欠損型では電流減少が見られなかった。さらに、野生型ミクログリアにおける GluR2 の膜局在性を免疫細胞染色により検討したところ、静止状態に比べて LPS により活性化したミクログリアでは、GluR2 の局在性が変化すると共に細胞表面での発現が低下したことから、GluR2 含有 AMPA 受容体が細胞膜上からエンドサイトーシスにより取り込まれ、その結果、グルタミン酸電流が抑制されることが考えられた。以上の結果から、ミクログリアにおける AMPA 受容体を介した  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は炎症反応に関与しており、AMPA 受容体の局在性は GluR2 によって制御され

ていることから、ミクログリアにおける GluR2 の重要性が示唆された。このような研究を通して、ミクログリアにおけるグルタミン酸受容体の生理的・病態生理的な役割の解明と、それに続くニューロン-グリア連関の解明につながる事が期待できる。

#### A6. ガラニンはラット脊髄膠様質ニューロンにおける後根刺激誘起の単シナプス性興奮性シナプス伝達を抑制する

岳 海源, 藤田亜美, 朴 蓮花, 水田恒太郎, 八坂敏一, 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))

ガラニンは、痛み伝達制御に重要な役割を果たす脊髄後角第II層(膠様質)ニューロンで自発性興奮性シナプス後電流(EPSC)の振幅を変えずに発生頻度を増加させると共に、膜の過分極や脱分極を誘起する。今回、ガラニンの痛み制御の役割の詳細を知るために、そのシナプス後細胞作用の抑制下で、後根電気刺激により誘起される単シナプス性の興奮性シナプス伝達、また、GABA やグリシンを介する抑制性シナプス伝達に及ぼすガラニン(0.1 $\mu$ M)の作用を調べた。実験は、成熟ラット脊髄横断スライスの膠様質ニューロンへホールセル・パッチクランプ法を適用することにより行った。調べたニューロンの87%でA $\delta$ 線維誘起EPSCの振幅を約35%、78%のニューロンでC線維誘起EPSCの振幅を約14%減少させた。同様な作用は2/3型のガラニン受容体(GalR2/3)作動薬 galanin 2-11でも見られた。残りのニューロンではEPSCは変化しなかった。自発性および局所神経刺激誘起の抑制性シナプス伝達はガラニンにより影響を受けなかった。以上より、ガラニンはGalR2/3を活性化してA $\delta$ 線維やC線維を介する単シナプス性の興奮性シナプス伝達をシナプス前性に抑制し、前者の作用は後者の作用より強いことが明らかになった。この作用は自発性興奮性シナプス伝達や膜電位の変化と共にガラニンの痛み伝達制御に寄与することが示唆される。

#### A7. デカノイルグレリンの分泌動態；ヒト血中における検討

葉 純子<sup>1,2</sup>, 西 芳寛<sup>1</sup>, 原 宗嗣<sup>3</sup>, 松石豊次郎<sup>3</sup>, 楠川仁悟<sup>2</sup>, 田中永一郎<sup>1</sup> (1久留米大学医学部生理学講座(脳・神経機能部門), 2同 歯科口腔医療センター, 3同 小児科学講座)

【緒言】グレリンは脂肪酸修飾で活性化ホルモンであり、オクタン酸修飾体「O-Ghrelin (O-Ghr)」の他にデカン酸修飾体「D-Ghrelin (D-Ghr)」が存在する。今回われわれはD-Ghr RIAを構築し、既報のGhrelin RIAと合わせて

75g-OGTT下のTotal Ghrelin (T-Ghr), O-, D-Ghrの血中濃度変化、空腹時血中T-, O-, D-Ghr濃度と肥満度(BMI)・血中脂質濃度との相関について検討した。【方法】75g-OGTT時及び空腹時ヒト血漿を前処理カラムにて精製後RIAに供した。【結果】75g-OGTT下で、D-Ghr濃度は負荷後60分で最低値をとり、その後再上昇した。このD-Ghrの血中動態はO-Ghrとは若干異なっていた。血中T-, O-Ghr濃度はBMIと有意な負相関を示し、D-GhrとBMI間にも弱い負相関を認めた。T-, O-Ghr濃度とHDL-Chol, TGとの間には、各々有意な正・負の相関が認められたが、D-GhrとHDL-Cholの間には有意な相関はなかった。正常者と比較して、糖尿病症例の血中T-, O-Ghr濃度は低下、D-Ghr濃度は上昇していた。【結語】D-GhrはO-Ghrと一部異なる分泌動態を示した。今後、D-Ghrの分泌動態と肥満症・糖尿病などの代謝性疾患との関連について検討を進めていく。

#### A8. 対乳児音声による産後うつ病スクリーニング可能性の検討

井上貴雄<sup>1</sup>, 池田英二<sup>1</sup>, 中川竜太<sup>2</sup>, 中山紀男<sup>3</sup>, 篠原一之<sup>1</sup> (1長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻神経機能学, 2旭化成株式会社音声ソリューションビジネス推進部, 3医療法人中山小児科クリニック)

対乳児音声(マザリーズ)は対成人音声と比較して、乳児の嗜好性が高く、言葉の獲得に適した音声であることが分かっている。一方、産後うつ病に罹患した母親は養育行動やマザリーズに関して拙劣であり、虐待を引き起こす危険性が高いため、母子間コミュニケーションに障害を来す要因の一つと考えられる。そこで、我々はマザリーズ音声による産後うつ病の音声的診断法について検討した。母親のマザリーズ表出能力(マザリーズ度)を客観的に評価するため、隠れマルコフモデルによるマザリーズ度評価モデルを構築し、乳児の選好聴取反応を用いた評価モデルの客観的性能評価を行うことで、高精度で母親のマザリーズ度を評価することができた。8ヶ月の乳児とその母親40組に対してエジンバラ産後うつ病質問票(EPDS)による調査とマザリーズ音声の収録を行うことで、産後うつ病が疑われる母親の検出とマザリーズ度の評価を行い、その関係性を調べた。その結果、EPDS得点とマザリーズ度との間に負の相関がみられた。さらに、EPDS得点が9点以上の「産後うつ病が疑われる」群のマザリーズ度は、9点未満の「非産後うつ病」群と比較して有意に低い値を示した。以上の結果より、産後うつ病の母親をスクリーニングする上で、音声的診断法が有効である可能性が示唆された。

#### A9. PKG リン酸化を介した TRPC6 チャネル活性化モードの短長期制御機構

菅 忠, 井上隆司, 瓦林靖広, 本田 啓 (福岡大学医学部生理学)

【目的】心血管系に広く発現する TRPC6 蛋白質は PLC 共役型受容体の刺激によって活性化される  $Ca^{2+}$  流入チャネルであり, PKG による負の制御を受けていることが知られている. 本研究では, PKG リン酸化が HEK 細胞に発現した TRPC6 チャネル活性に及ぼす効果について, 更に詳細な検討を行った.

【結果】PKG 活性化薬, 8Br-cGMP (100 $\mu$ M) は, 受容体刺激 (カルバコール 10 $\mu$ M 投与) による TRPC6 電流の活性化を急速且つ強力に抑制したのみならず, 2,4,6-trinitrophenol (500 $\mu$ M) による電流活性化増強作用 (細胞膜外層部への挿入による膜伸展刺激を介する) をもほぼ完全に抑制した. この抑制作用は, TRPC6 電流を, 内因性ジアシルグリセロールレベルを上昇させる作用のある RHC 80267 (100 $\mu$ M) で活性化し, 更に機械刺激のメディエータである 20-HETE (100nM) の細胞内投与によって増強した場合にも観察された. 更に, T69 をアラニンで置換した TRPC6-T69A 変異体では, この作用が消失していることが明らかとなった. 一方, 8Br-cGMP (100 $\mu$ M) を 20 分以上の長期間に亘って細胞内へ投与すると, TRPC6 様の自発電流の漸増的活性化が観察された. この電流は, 細胞外液中の  $Na^+$  を NMDG $^+$  で置換するとほぼ消失し, 受容体刺激, 機械刺激に対する応答性を示さなかった. 同様の現象は, T69A 変異体においても観察された.

【結論】以上の結果から, PKG による T69 のリン酸化は, 機械刺激による TRPC6 チャネルの活性化増強効果の抑制に必須であり, この作用は 20-HETE の増強作用を消失させることによって生じていることが強く示唆された. 更に, PKG の遷延した活性化は, TRPC6 チャネルの自発活性化モードへの転換を促進することが示唆された.

#### A10. ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化過程における TRPC1 を介した $Ca^{2+}$ 流入の促進効果

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

【目的】脱落膜化過程における TRP 蛋白質を介した  $Ca^{2+}$  動態が果たす役割について検討した.

【方法】子宮内膜組織から酵素処理によって間質細胞 (hESC) を単離し, エストラジオール ( $E_2$ , 10nM) 及びプロゲステロン ( $P_4$ , 1 $\mu$ M) の存在下で培養した. RT-PCR 法, real-time PCR 法, ウェスタンブロット法, 免疫細胞化学的検査法, デジタル蛍光画像解析法による生化学・形態

学・生理機能的検討を行った.

【結果】無刺激下の hESCs には, TRPC1 を含む 9 つの TRP アイソフォームが発現していた. hESCs を  $E_2/P_4$  で 7-14 日間処理すると, 脱落膜化時に特徴的 (大型化, 類円形化) な形態変化が引き起こされた. それに伴い, 脱落膜化マーカー IGFBP-1 (insulin-like growth factor-binding protein-1) の発現増加が観察された. それと並行して, ストア枯渇刺激活性化  $Ca^{2+}$  チャネル (SOC) の構成分子であると考えられている TRPC1 蛋白質の発現増加と, SOC 活性の著明な増加が観察された. 次に, siRNA 法で TRPC1 蛋白質の発現をノックダウンすると,  $E_2/P_4$  添加で誘発される IGFBP-1 の発現増加が抑制され, 同時に SOC 活性も減少した. また, SOC 阻害薬である SKF96365 は, 濃度依存的に hESCs の SOC 活性を阻害し,  $E_2/P_4$  と同時投与することによって hESCs の IGFBP-1 の発現増加に対する有意な抑制効果を示した. 更に TRPC1 特異抗体 (T1E3 抗体) を細胞外から添加した場合も, 同様の抑制効果が観察された.

【結論】以上の結果から, 卵巣ステロイドホルモンによる hESCs の分化 (脱落膜化) 過程において, TRPC1 蛋白質の増加とそれに伴う SOC を介した  $Ca^{2+}$  流入が極めて重要な役割を果たしていることが強く示唆された.

#### A11. 消化管筋線維芽細胞における TRPC1 の役割

海 琳, 瓦林靖広, 本田 啓, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学研究室)

クローン病 (CD) や潰瘍性大腸炎 (UC) などの炎症性腸疾患 (IBD) は, 自己免疫異常に起因し, 長年に亘って生活の質を劣化させる難治性の疾患として問題になっている. 本研究は炎症部位へ分化・遊走する筋線維芽細胞およびそれより産生される炎症性サイトカインを標的として, 腸管組織の炎症・線維化に関わる筋線維芽細胞内  $Ca^{2+}$  シグナル伝達機構について検討を行った. 筋線維芽細胞は線維芽細胞の亜種であり, 消化管障害の初期に病変部へ遊走し創傷治癒に寄与が, その過剰反応が慢性腸病変の炎症・線維化につながる. 我々は種々の物理化学刺激により活性化される  $Ca^{2+}$  チャネル遺伝子群 TRP 蛋白質に着目して, 筋線維芽細胞における  $Ca^{2+}$  シグナル伝達と腸管炎症・線維化における潜在的な役割について検討を行った. 我々の研究結果より, ヒトまたはラット腸管単離筋線維芽細胞において TNF $\alpha$  刺激によって惹起される TRPC1 を介する  $Ca^{2+}$  流入は NF- $\kappa$ B の核移行を抑制し, COX-2 依存性 PGE2 産生を抑える働きがあることが明らかとなった. この結果から, 筋線維芽細胞 TRPC1 による  $Ca^{2+}$  流入を介した転写因子制御が腸管炎症の進行や改善に重要な役割を果たすことが示唆された.

### A12. Multiple molecules of calmodulin bind to the Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channel

H. Asmara, E. Minobe, Z.A. Saud, M. Kameyama (Dept. Physiol., Grad. Sch. Med. & Dent. Sci., Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan)

Calmodulin (CaM) plays a pivotal role in both Ca<sup>2+</sup>-dependent facilitation (CDF) and inactivation (CDI) of the Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channel. Although CaM binding to the Cav1.2 channel at multiple sites has been reported, it is unclear how CaM interacts with the channel during CDF and CDI. In this study, we have examined the binding of CaM to the Cav1.2 channel of guinea pig by a pull-down method using glutathione-S-transferase-fused fragment peptides. We found that CaM bound to the N-terminal tail (NT) (Ala<sup>66</sup>-Lys<sup>93</sup>), I-II loop (Phe<sup>437</sup>-Asn<sup>553</sup>), preIQ (Leu<sup>1599</sup>-Asp<sup>1639</sup>) and IQ regions (Tyr<sup>1648</sup>-Leu<sup>1668</sup>) of the C-terminal tail of Cav1.2 at 2 mM [Ca<sup>2+</sup>], with affinity sequence IQ > preIQ > I-II loop > NT. We also found that approximately 2 mol/mol CaM bound to a peptide containing preIQ and IQ regions (Leu<sup>1599</sup>-Leu<sup>1668</sup>) with several important amino acid residues in the preIQ region (Glu<sup>1612</sup>; Ile<sup>1618</sup>; Leu<sup>1629</sup>; Leu<sup>1630</sup>) and one important amino acid residue in the IQ region (Ile<sup>1653</sup>) for CaM binding. These results support the hypothesis that multiple molecules of CaM can bind to the C-terminal tail of Cav1.2. Based on these results, possible conformations of the CaM/channel complex during CDF and CDI are discussed.

### A13. Semi-simultaneous Imaging of Intracellular Calcium and Association of Ca<sup>2+</sup> entry channel-calmodulin

森 誠之, 今井裕子, 井上隆司 (福岡大学医学部生理学)

イオンチャンネル, 特に細胞内カルシウム動員に関与するイオンチャンネルにおいてカルシウム結合分子カルモジュリン (CaM) は重要な機能を担う。その機能はチャンネルの開閉から, 膜輸送など多岐に及ぶ。更にはローカル Ca<sup>2+</sup> やグローバルな Ca<sup>2+</sup> をカルモジュリンは個別に感知し, 異なるチャンネル制御へと分配するセンサーとして機能することも明らかとなってきた。本研究は細胞内カルシウム動態とチャンネル-CaM 相互作用を定量的かつ, 同時にイメージングするシステムを開発し, カルシウム依存的チャンネル制御機構を明らかにする目的としている。カルシウム dye として, Fura-2 (AM 体), CaM とチャンネル相互作用を FRET (CFP, YFP 融合 Protein) にて行った。現在, 細胞

内カルシウム濃度と CaM-チャンネル断片 (L-type Ca channel IQ ドメイン, TRPC6 CBD) の間に生じる FRET において, 同期的な変動を確認することができている。これらチャンネル-CaM の相互作用は MLCK (Myosin Light Chain Kinase) CaM 結合領域 'M13'-CaM と比べ, 高濃度カルシウム依存性を示していた。チャンネル近傍で局所的に上昇する高濃度 Ca<sup>2+</sup> によりのみ反応する上で, 重要なメカニズムと考えられた。

### A14. ラット副腎髄質細胞におけるムスカリン受容体を介した神経情報伝達

井上真澄, 藁科 彬, 原田景太, 松岡秀忠 (産業医科大学医学部第2生理学)

ラット副腎髄質細胞においてムスカリン受容体刺激は, TASK1 チャンネルを抑制してアドレナリン分泌を促進する。今回, このムスカリン受容体シグナル系に関与するムスカリン受容体サブタイプの同定, およびこのシグナル系の神経情報伝達への関与を, 分子生物学的手法, および Ca イメージング法を用いて検討した。ラット副腎髄質細胞にはムスカリン受容体サブタイプ m4 と m5 が mRNA および蛋白レベルで発現していた。oxotremorine-M による TASK チャンネル抑制は, ムスカリンより低濃度で起り, その EC<sub>50</sub> は約 3 μM であった。oxotremorine は TASK チャンネルをほとんど抑制しなかった。ラット副腎灌流標本において, 神経刺激により誘発される副腎髄質細胞の興奮性の増加の 90% は, ニコチン受容体拮抗薬の C6 により抑制され, 残りの成分はアトロピンにより影響を受けなかった。しかし, choline esterase 抑制薬の neostigmine 存在下での神経刺激による興奮性の増加の C6 非感受性成分は, アトロピンにより抑制された。以上の結果より, ラット副腎髄質細胞には, ムスカリン受容体の m4 と m5 サブタイプが発現していること, 生理的条件下では内臓神経からの神経伝達には主にニコチン受容体が関与しており, ムスカリン受容体は関与しないことが明らかになった。

### A15. 血管トーン制御における TRPC3/NCX1 共役系の役割

喜多紗斗美, 伊豫田拓也, 岩本隆宏 (福岡大学医学部薬理学)

α<sub>1</sub> 受容体は様々な臓器血管の神経性調節に重要な役割を果たしているが, α<sub>1</sub> 受容体を介する血管収縮機序については未だ十分に解明されていない。最近, 私達は α<sub>1</sub> 受容体刺激による血管収縮に 1 型 Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> 交換体 (NCX1) が関与することを示す実験的証拠を得た。具体的には, 血管平滑筋特異的 NCX1 高発現マウスでは野生型マウスに比べてフェニレフリン刺激時の血管収縮 (細胞内 Ca<sup>2+</sup> シグナ

ル)が有意に増大していること、またこれらの血管反応は特異的NCX阻害薬により抑制されることを見いだした。さらに、血管平滑筋細胞を用いた免疫沈降実験、免疫染色実験およびショ糖密度勾配分離実験により、NCX1はTRPC3と相互作用しカバオラ画分に共存していることが分かった。そこで、血管平滑筋特異的TRPC3高発現マウスを作製したところ、フェニレフリン刺激時の血管収縮(細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナル)が顕著に増大することを観察した。また、NCX1およびTRPC3の高発現マウスに高濃度のノルエピネフリンを静脈内投与すると、共に冠スパスムに起因する心電図ST上昇が誘発された。この冠スパスムはNCX阻害薬処置および抑制型TRPC3遺伝子導入により抑制された。これらの結果は、TRPC3/NCX1共役系が $\alpha_1$ 受容体を介する血管トーン制御に重要な役割を果たすことを示唆している。

#### A16. 「反応性充血」の指尖容積脈波二次微分波(SDPTG)による評価。動脈硬化評価への応用

今永一成<sup>1</sup>、原 寛<sup>2</sup> (1特別養護老人ホームなごみの里：健康管理センター、2原土井病院)

SDPTGは原波形変曲点の数値化により血管動態を客観的に評価出来る。先に、SDPTGの|b/a|が駆動波成分、器質の変化(伸展性変化)を、|d/a|が反射波成分、機能的変化、器質の変化(伸展性変化)を評価出来ることを示してきた(1998-)。今回、動脈硬化評価の一つの内皮細胞由来NOを基盤因子とする「反応性充血」を、末梢動脈伸展性と|b/a|、|d/a|との関係から解析することを試み、多数臨床例に応用した(上腕1分血流遮断前、開放30秒後、左或いは右第2指SDPTGの比較)。その結果、「反応性充血」において、高伸展性血管(若年者、血液脂質、糖質、血圧など全て正常)では|b/a|の増加、|d/a|の低下が、低伸展性動脈硬化(高脂血症、糖尿病、高血圧症)では|b/a|の減少、|d/a|の増加が再現性良好に得られた。「反応性充血」のSDPTGによる解析は、従来より、より簡易にかつより良好な再現性をもって動脈硬化進展を評価出来ることが示唆された。

#### A17. 感情認知の感受性と性格傾向の関連性—音声刺激を用いた検討—

藤澤隆史、時津裕子、土居裕和、篠原一之(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科学講座神経機能学分野)

本研究では、モーフィングにより感情表出の強度が異なる音声感情守護とに作成し、認知実験によって個人ごとに各感情に対する「感受性」を定量的に算出した。また個

人ごとの各感情に対する感受性と協調性・共感性の関連性を検討するために、主要5因子性格検査(Big5)と共感性尺度を用いた質問紙検査を実施した。

実験対象者は、中高生27名(男性13名、女性14名)であり、表出強度が6段階でことなる3種類の感情音声(喜び、怒り、悲しみ)をランダムに呈示した。音声刺激には独自に構築した感情音声データベースより、表出度の高い男子中学生3名の音声抽出して用いた。実験対象者は48種類の音声について強制選択法によって感情種を判断した。

その結果、「怒り」に対する感受性において性差が見られ、表出強度に関わらず女性は男性よりも怒りに対する感受性が高いことが明らかになった。また共感性尺度においても性差が見られ、視点取得因子において女性は男性よりも得点が有意に高かったことから、怒りに対する感受性と共感能力の関連性が示唆された。また「喜び」と「悲しみ」について、対象者全員の感受性と各心理尺度との関連性を検討した結果、悲しみの感受性と協調性(Big5)が有意に関連することが見出された。

本研究の結果より、ネガティブな感情音声に対する感受性は協調性・共感性と関連している可能性が示唆された。

#### A18. 感情認知の感受性と性格傾向の関連性—表情刺激を用いた検討—

時津裕子、藤澤隆史、土居裕和、篠原一之(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科学講座神経機能学分野)

他者との円滑なコミュニケーションには、非言語的な情報(とりわけ表情)から、相手の感情を鋭敏に察知する能力が重要であると考えられる。本研究の目的は、客観的な手法により、表情を介した感情認知能力を測定し、その結果を集団間で比較することであった。また当該能力と個人の性格傾向の関連性について検討することであった。実験には中高生男子(n=16)、中高生女子(n=14)、および小学生男子(n=13)が参加した。「喜び」および「怒り」の感情カテゴリーについて、表出強度を様々に変化させた表情刺激を呈示し、カテゴリー判断を求める課題を通じて、被験者の感情認知能力の測定を試みた。また共感性尺度質問紙(Davis, 1983; 桜井, 1988)を実施した。

表情認識率(正反応率)が50%に達する表出強度を認識感度と定義し、その値を群間で比較したところ、喜びに対する中高生女子の感度が同年齢の男子と比較して高い(より鋭敏である)可能性が示唆された( $t(28)=1.37, p=.09$ )。また個人の性格傾向との関連において、中高生女子群では、共感性尺度の下位項目(共感的配慮、視点取得)で高得点

を獲得している被験者は、喜びの認識感度が高い（鋭敏である）という結果が得られた（ $r = -0.36$ ,  $p < .05$ ;  $r = -0.41$ ,  $p < .05$ ）。

#### A19. マウス大脳皮質聴覚野の領野構成

田中良秀, 西村方孝, 長谷川佳代子, 斎藤和也, 宋文杰（熊本大学大学院医学薬学研究所知覚生理学分野）

マウスの大脳皮質聴覚野についてこれまで数多くの研究がなされてきたが、その領野構成に関してまだ統一した見解が得られていない。今回我々は膜電位感受性色素を用い、マウス大脳皮質聴覚野全体の活動をイメージングした。その結果、従来報告されていた一次聴覚野や前聴覚野の存在およびそれらの領野のトノトピーが確認できたとともに、前聴覚野のさらに吻側部に音刺激に応答する新しい領野を見出した。この領野をR野と名付けた。R野はこれまでの皮質に関する報告から、体性感覚野内に位置していると思われる。従って、R野の応答については、音刺激が体性感覚野になってしまっていることによる可能性を考慮する必要がある。しかし、音圧を変えた時に、R野の応答振幅は前聴覚野と線形関係にあることと、R野に吻尾方向のトノトピーが見られることから、R野が聴覚刺激に応答していると考えられる。以上の結果より、マウス聴覚皮質において前聴覚野の吻側部に新規の聴覚領野が存在すると結論できる。

#### A20. 睡眠の質が就学前後児の注意機能に与える影響の検討

加藤美香子, 土居裕和, 篠原一之（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻神経機能学分野）

近年、睡眠時間の短縮や質の低下が注意機能の減退の要因となることが危惧されているが、その因果関係についての実証的な研究はない。

注意機能は、1) 集中を持続する能力である注意持続力、2) 特定の方向に注意を向ける注意定位能力、3) 特定の対象に注意を絞込む選択的注意能力に分類される。

これらを踏まえて、本研究では6歳児童計20名および、4歳児14名を対象に、アクチグラムによる4日間の夜間睡眠計測と認知課題による注意機能の計測を行なうことによって、睡眠の質が注意機能のそれぞれの側面に与える影響を検討した。注意機能測定検査としては、上に挙げた3つの注意機能の評価法として広く用いられている幼児用ANT（Attention Network Task）を用いた。

分析では、アクチグラムで計測した各睡眠パラメータと、ANTによって計測された注意機能との相関を検討した。その結果、6歳児では葛藤解決に要する能力（実行機能）の働きと夜間の総睡眠時間との間に負の相関があったが、4

歳児ではこのような傾向は見られなかった。この結果は、睡眠の質が注意機能に与える影響には発達的变化があることを示唆している。

#### A21. ラット空腸での糖の消化・吸収に対するクロロゲン酸、カフェ酸およびカフェインの作用

清末達人（西南女学院大学保健福祉学部栄養学科）

【目的】近年、コーヒー飲用習慣が2型糖尿病の発症を抑制するとの報告が目ざされている。本研究では、コーヒーに含まれるクロロゲン酸、カフェ酸、カフェインがラット空腸での glucose 吸収と、麦芽糖の消化に与える作用について検討した。【方法】ウレタン麻酔下でラットを開腹、トライツ角より数 cm 肛門側から糖を含む生理食塩水を灌流し、約 10 cm 肛門側で収集した溶液の glucose 濃度を glucose-6-phosphate dehydrogenase/hexokinase 法にて測定した。【結果】クロロゲン酸 (8.4 mM) とカフェ酸 (5.5 mM) は、 $\text{Na}^+$  依存性 glucose 輸送体 (SGLT1) の阻害剤、phloridzin (1 mM) 存在下で、麦芽糖 (100 mg/dl) を灌流した場合に回収液に出現する glucose 量を有意に減少させた。一方、カフェイン (10 mM) は、これを有意に増加させた。また、クロロゲン酸 (120 mg/Kg 体重) は、胃への麦芽糖 (2 g/Kg 体重) 負荷による血糖値上昇の最大値を有意に低下させた。【結語】以上の結果は、コーヒー飲用による2型糖尿病罹患リスク軽減の一部に、クロロゲン酸とその分解産物の有する  $\alpha$  グルコシダーゼ阻害による血糖値上昇抑制作用が関与しているという説を支持する。

#### A22. アシル CoA の酸化還元能に対するメチル基の効果

佐藤恭介<sup>1</sup>, 二科安三<sup>2</sup>, 玉置春彦<sup>3</sup>, 瀬戸山千秋<sup>3</sup>, 志賀潔<sup>4</sup> (<sup>1</sup>熊本大院・医学薬学研究所・分子生理, <sup>2</sup>熊本大・医・保健学科・生理機能検査, <sup>3</sup>熊本大院・医学薬学研究所・分子酵素化学, <sup>4</sup>九州看護福祉大・看護)

プロピオニル CoA の 2,3 脱水素反応 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CO-S-CoA} \rightarrow \text{CH}_2=\text{CH-CO-S-CoA} + 2\text{H}$ ) の中点電位は +70 mV、ブチリル CoA の 2,3 脱水素反応 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-S-CoA} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CH}=\text{CH-CO-S-CoA} + 2\text{H}$ ) の中点電位は -10 mV と報告されている。すなわち、脱水素される部位にメチル基が一つ存在すると、中点電位は 80 mV 低下する。今回、さらに 2 位にメチル基のついた、2-メチルブチリル CoA の 2,3 脱水素反応 ( $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CO-S-CoA} \rightarrow \text{CH}_3\text{-CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CO-S-CoA} + 2\text{H}$ ) の中点電位を測定し、-44 mV と求めた。分子軌道計算により分子の最適化構造を求めたところ、2 位のメチル基がないときは、脱水素後の分子は S 原子から 3 位の C 原子まで平面構造をとり  $\pi$  電子系が最

安定化されていた。しかし2位にメチル基があるとS原子との立体障害により平面構造が崩れ、その分高エネルギー状態にあることが分かった。3-メチル基により80mV低下した中点電位が、2-メチル基では34mVしか低下しないのはそのためと考えられる。

### B23. 近赤外分光法による注意機能ネットワークの解析

土居裕和, 加藤美香子, 西谷正太, 篠原一之 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻神経機能学分野)

空間的注意の制御を司る脳機能部位すなわち注意機能ネットワークの解明は認知神経科学の主要な課題の一つであり、既に多くの研究が存在するが、未だ一貫した知見が得られていない。そこで、本研究では近赤外分光法を用い、注意課題遂行中の大脳皮質活動を測定した。

実験では、能動的注意の定位を必要とする視覚探索課題と、選択的注意を必要とするフランカー課題遂行中の血中酸化ヘモグロビン濃度変化を、背外側前頭前野、上頭頂葉で計測した。

その結果、視覚的探索課題では、背外側前頭前野活動が抑制されるのに対し、フランカー課題では同部位が賦活化されることが見出された。一方、フランカー課題では頭頂葉の賦活は見られなかったが、視覚的探索課題では右頭頂葉が賦活する側性化傾向が見出された。

これらの結果は、背外側前頭前野・上頭頂葉の空間的注意制御への関与を示唆している。その一方で、各部位の賦活状態は課題特異的に変化したことから、各部位には明確な機能分化がみられることを示唆している。

### B24. 近赤外分光法 (NIRS) による養育における絆に関わる脳基盤の探索

田中勝則<sup>1,2</sup>, 西谷正太<sup>1</sup>, 高村恒人<sup>1</sup>, 菅原正志<sup>2,3</sup>, 篠原一之<sup>1</sup> (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科神経機能学,<sup>2</sup>長崎大学心の教育総合支援センター,<sup>3</sup>長崎大学教育学部)

近年、母性愛や愛着等、養育における絆の脳基盤が母親を対象に調べられ、前頭前野の関与が示唆されている。しかし、養育における絆は母親に限らずとも生じ得る為、前頭前野の関与については母親のみを対象とした研究だけでは充分ではない。進化論の立場からは祖母が子孫の養育において重要な役割を果たすことを示唆する「おばあさん仮説」が展開されていることから、本研究では祖母を対象に母性愛に関連する脳部位の特定を目的として、NIRSによる脳活動計測を行った。実験は、自身に妊娠・出産の経験があり、孫がいる、という条件を満たす50-70代の女性13名を対象に行った。全ての被験者は右利きであり、MMSE

(ミニメンタルステート検査)により認知症の疑いは認められなかった。NIRSプローブを装着した後、被験者には17インチのモニタ上に提示される実孫および年齢をマッチングさせた他孫の表情(無表情・笑顔ともに30秒ずつ提示)の観察を求め、その際のOxyHb濃度の測定を行った。その結果、実孫の笑顔を見た際には左右の前頭前野に活動性の増加が認められたが、他孫の笑顔を見た際には前頭前野に活動性の増加は認められなかった。また、実孫と他孫の条件間で活動性の比較を行ったところ、実孫の笑顔を見た際に有意な活動性の増加が認められた。したがって、母親だけでなく、祖母においても養育における絆に前頭前野が関与する可能性が新たに示唆された。

### B25. 近赤外分光法 (NIRS) によるヒト母性行動に関わる脳機能部位の同定および育児経験がもたらす影響の解明

西谷正太<sup>1</sup>, 馬場遙子<sup>1</sup>, 吉元崇文<sup>1</sup>, 大森淳子<sup>1</sup>, 木佐貫芳恵<sup>1</sup>, 池田英二<sup>1</sup>, 土居裕和<sup>1</sup>, 高村恒人<sup>1</sup>, 尾仲達史<sup>2</sup>, 篠原一之<sup>1</sup> (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・神経機能学,<sup>2</sup>自治医科大学医学部・神経生理学)

妊娠・出産・授乳によって、母親の脳には構造的・機能的再編がもたらされることが、齧歯類を対象としたこれまでの多くの動物実験からわかっている。一方、ヒトにおいても母親の脳には構造的・機能的再編がもたらされている可能性が一部示唆されている。また、母親では、わが子の笑顔動画の提示に対し、前頭前野の活動が増加することが報告されていることから、前頭前野はわが子との絆に関与していることが示唆されている。これらを踏まえ、本研究では母親の前頭前野には構造的・機能的再編がもたらされているという仮説の下、母親、非母親(保育士、それ以外の未産婦)を対象に前頭前野の活動性の違いを調べることを目的として、NIRSによる脳活動計測を行った。実験は、NIRSプローブを装着した後、被験者には17インチのモニタ上に提示される乳児の表情を識別する課題を行わせ、その際のOxyHb濃度の測定を行った。その結果、母親では前頭前野に活動性の増加が多くの領域で認められ、保育士でも一部認められた。一方、未産婦では前頭前野に活動性の増加は認められなかった。また、群間の比較を行ったところ、母親は、保育士、未産婦に比べ、右前頭前野腹内側領域に有意な活動性の増加が認められた。したがって、女性が母親になることで、前頭前野に構造的・機能的再編がもたらされるという本研究の仮説が支持され、とりわけ、右腹内側領域がその中心である可能性が示唆された。

### B26. 近赤外分光法 (NIRS) による学童の愛着に関わる脳機能の解明



高村恒人<sup>1,2</sup>, 西谷正太<sup>1</sup>, 吉本崇文<sup>1</sup>, 馬場遥子<sup>1</sup>, 綱分憲明<sup>2</sup>, 篠原一之<sup>1</sup> (<sup>1</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・神経機能学分野, <sup>2</sup>長崎県立大学大学院人間健康科学研究科・運動生理学)

ボウルビーの愛着理論によると, 愛着とは, 養育者に対して形成する絆であると定義されており, 乳児期に始まるとされている。最近, 乳児期の愛着に関わる脳領域が調べられ, 前頭前野が関与していることが報告された。しかし, 乳児期以降の愛着については, 親子関係をはじめ, 対人関係の基盤であり, 重要な脳機能であるにもかかわらず, その脳領域について調べる研究がほとんど行われていない。そこで, 本研究では, 学童期の男児を対象に愛着に関わる脳領域の特定を目的として, NIRSによる脳活動計測を行った。実験は, 平均年齢9.4歳の小学生男児26名を対象に行った。また, エジンバラ利き腕質問紙により, 全ての被験児は右利きであることを確認した。NIRSプローブを装着した後, 被験者には17インチのモニタ上に提示される実母および年齢をマッチングさせた他児の母の表情(無表情・笑顔ともに30秒ずつ提示)の観察を求め, その際のOxyHb濃度の測定を行った。その結果, 実母の笑顔を見た際には右の前頭前野に活動性の増加が認められたが, 他児の母の笑顔を見た際には前頭前野に活動性の増加は認められなかった。また, 実母と他児の母の条件間で活動性の比較を行ったところ, 実母の笑顔を見た際に有意な活動性の増加が認められた。したがって, 乳児期以降の学童においても愛着に前頭前野が関与する可能性が新たに示唆された。

#### B27. 細胞容積調節性アニオンチャネルのPI3Kによる調節機構

山本信太郎<sup>1,2</sup>, 市島久仁彦<sup>2</sup>, 岩本隆宏<sup>1</sup>, 顛原嗣尚<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>福岡大学医学部・薬理学, <sup>2</sup>佐賀大学医学部・生体構造機能学, <sup>3</sup>長崎国際大学・薬・生理学)

細胞容積調節性アニオンチャネル(VRAC)は, 細胞容積調節やアポトーシス性細胞死に関わることが報告されているが, その調節機構については十分には明らかではない。今回我々は, マウス単離心室筋細胞にホールセルパッチクランプ法を適応し, 低浸透圧刺激で活性化させたVRACを介するクロライド電流を測定した。細胞の容積変化は, ビデオ画像の面積変化で計測した。各種Gq蛋白質共役型受容体刺激薬やホスホリパーゼC(PLC)の直接的刺激薬, ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K)抑制薬によって, VRAC電流の活性化やVRACとの密接な関与が知られている調節性容積減少(RVD)は, いずれも減弱または消失していた。これらのVRAC電流の抑制は, PIP3細胞内投与

で消失したことから, PI3Kの基質や産物である, PIP2やPIP3の減少によってVRAC活性化が抑制されていたと考えられた。更にPI3KによるPIP3産生が減弱することが想定されるI型糖尿病モデルマウス, カベオリン3ノックアウトマウスの心筋細胞でもVRAC電流やRVDは減弱または消失していた。以上より, PI3Kによるイノシトールリン脂質シグナリングがVRAC電流の活性化へ関与していることが示唆された。

#### B28. 破骨細胞の酸刺激活性化Cl<sup>-</sup>電流に対する抗CIC7抗体の抑制作用

大城希美子, 岡本富士雄, 鍛冶屋 浩, 根本哲臣, 来海慶一郎, 中山修二, 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)

破骨細胞に発現するCIC7Cl<sup>-</sup>チャネルは, 骨吸収に必須の酸(HCl)分泌を支える重要な機能分子である。このCIC7の点変異は, 骨吸収を低下させ骨大理石病をもたらす。我々は, マウス破骨細胞を酸刺激すると細胞外pHの低下とともに外向整流性Cl<sup>-</sup>電流(I<sub>Cl acid</sub>)が活性化されることを報告した。今回は, 破骨細胞に誘発されるI<sub>Cl acid</sub>とCIC7との関係を明らかにするため, 骨大理石病患者に認められるCIC7の変異部位をターゲットにした複数の抗CIC7抗体を作成しI<sub>Cl acid</sub>への影響を調べた。前駆破骨細胞(Raw264.7)を破骨細胞分化因子RANKLで刺激し分化誘導すると, CIC7の発現が上昇し, これに伴ってI<sub>Cl acid</sub>も増大した。また, Raw264.7にCIC7を強制発現させると分化誘導刺激の有無に関係なくI<sub>Cl acid</sub>が強ク活性化された。分化誘導刺激したRaw264.7およびnativeなマウス破骨細胞に誘発されるI<sub>Cl acid</sub>は抗CIC7抗体を前投与すると抑制された。また, 破骨細胞の骨吸収活性は抗CIC7抗体の前投与により低下した。以上の結果より, 破骨細胞から誘導されるI<sub>Cl acid</sub>にはCIC7の活性が含まれていると考えられる。抗CIC7抗体は, CIC7の活性を低下させて酸分泌を抑制すると考えられ, 骨吸収亢進を伴う骨破壊性疾患の治療への応用が期待できる。

#### B29. 筋性幹細胞由来 SPOC 細胞の電気生理学的性質

塩谷孝夫<sup>1</sup>, 宮西隆幸<sup>2</sup> (<sup>1</sup>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, <sup>2</sup>長崎大学環境科学部)

骨格筋の筋性幹細胞中には, 心筋細胞への分化能を持つ細胞群 SPOC (Skeletal Precursors Of Cardiomyocytes) の存在が報告されている。我々はラット骨格筋の SPOC 細胞を培養し, その電気生理学的性質をパッチクランプ法で検討した。生理的条件下(37°C)で, SPOC 細胞は自動能を示した。この自動能は, Cd<sup>2+</sup>(100μM) やニフェジピン (10

$\mu\text{M}$ の投与で消失し、カフェイン(40mM)投与や、BAPTA(1mM)の細胞内投与でも消失したことから、CICR機構の関与が示唆された。Apamine(0.2 $\mu\text{M}$ )の投与は自発活動電位の発生周期を短縮し、さらにapamine感受性の一過性K電流が記録されたことから、自動能へのCa-activated Kチャンネルの関与が示唆された。この自動能は、細胞外液の $\text{Na}^+$ の $\text{Li}^+$ への置換や $\text{Ni}^{2+}$ (1mM)の投与で消失し、Na/Ca交換の関与が示唆された。薬物投与後の自発活動電位の回復過程では、振幅2~5mV、周期100~200msの膜電位振動が観察された。SPOC細胞では、CICRによる細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇がNa/Ca交換を介した内向き電流と、Ca-activated Kチャンネルを介した外向き電流を同時に誘発し、これらのバランスが自動能の形成に重要な役割を果たすと結論した。

### B30. トランスジェニックラットを用いた下垂体後葉ホルモン研究

加藤明子<sup>1,2</sup>、藤原広明<sup>1</sup>、大淵豊明<sup>1,2</sup>、鈴木秀明<sup>2</sup>、上田陽一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>産業医科大学医学部第1生理学、<sup>2</sup>産業医科大学医学部耳鼻咽喉科学)

下垂体後葉系では抗利尿ホルモンのバゾプレッシンと子宮筋の収縮や射乳反射を引き起こすオキシトシンの2種類のホルモンが産生される。この2つのホルモンは視床下部室傍核および視索上核に局在する大細胞性神経分泌細胞の細胞体で産生され、下垂体後葉に投射した軸索終末から循環血中に分泌される。我々はすでにバゾプレッシンを産生する大細胞性神経分泌細胞に緑色蛍光タンパク(eGFP)を発現させることに成功している。今回は、青色蛍光タンパク(eCFP)遺伝子をオキシトシン遺伝子に挿入した融合遺伝子を用いてトランスジェニックラットを作出し、オキシトシン産生細胞およびその軸索を可視化することを試みた。その結果、本トランスジェニックラットにおいて(1)室傍核および視索上核にeCFP遺伝子が特異的に発現していた。(2)室傍核、視索上核および下垂体後葉に蛍光顕微鏡下で青色蛍光が観察された。(3)2%高張食塩水の飲水負荷により青色蛍光の変化が観察された。(4)視索上核から急性単離した神経分泌細胞においても青色蛍光が観察された。

また、同一個体でのバゾプレッシン-eGFPおよびオキシトシン-eCFPを発現するダブルトランスジェニックラットの作出も試みた。その結果、同一個体で視床下部および下垂体後葉に緑色蛍光と青色蛍光を発現したラットを得ることができた。今後、これらのラットは下垂体後葉ホルモン研究へ広く応用できると期待される。

### B31. 恒常的活性型CaMKKの発現は長期記憶の形成に障害を生じる

○貝塚拓<sup>1,2</sup>、李勝天<sup>3</sup>、高雄啓三<sup>4</sup>、宮川剛<sup>4</sup>、松下正之<sup>1,5</sup> (<sup>1</sup>三菱化学生命科学研究所、<sup>2</sup>熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学分野、<sup>3</sup>上海交通大学神经科学研究所、<sup>4</sup>京都大学大学院医学研究科先端技術センター生体遺伝子機能解析研究グループ、<sup>5</sup>琉球大学医学部形態機能医科学講座生理学第一分野)

CaM kinase kinase (CaMKK)はCaMKカスケードの最も上流の酵素であり、下流のCaMKIおよびCaMKIVをリン酸化する。さらに、CREB依存性の転写を促進し、海馬長期増強(LTP)および学習・記憶に関与する。我々は、マウスにおいてCaMKKの活性化は学習・記憶の改善を導くのではと考え、恒常的活性型CaMKK(CaMKKc)を発現するトランスジェニックマウスで行動学的解析を行った。バーンズ迷路実験では、CaMKKcトランスジェニックマウスの短期参照記憶は野生型に比べ何ら変化ないのに対し、長期参照記憶の特異的な障害が見られた。また、恐怖条件付けでも同様に、長期記憶の著明な障害が見られた。さらに、海馬LTPを測定したところ、野生型に比べLTPが有意に抑制された。CaMKKcトランスジェニックマウスの培養神経細胞では、基質であるCaMKIのリン酸化は定常状態で有意に上昇するが、一方でBDNFおよびKClの刺激下では野生型との間で有意な差はなかった。以上の結果から、CaMKKは長期記憶に深く関連すること、さらに、記憶の獲得にはCaMKカスケードの正常な活性化が必要であることが示唆された。

### B32. Methylphenidate (MPH) 投与による注意欠陥多動性障害(ADHD)モデルラットのfrontal cortexのカテコールアミン量

古島由紀<sup>1,3</sup>、石松秀<sup>1</sup>、山田麻記子<sup>2</sup>、河原幸江<sup>2</sup>、西昭徳<sup>2</sup>、赤須崇<sup>1</sup> (<sup>1</sup>久留米大医理学講座統合自律機能部門、<sup>2</sup>久留米大医薬理学講座、<sup>3</sup>福岡和白リハビリテーション学院)

ADHDモデルラット(spontaneously hypertensive rat: SHR)と対照ラット(Wistar rat)に対して、MPHを投与し*in vivo* microdialysis法により右内側前頭前野(mPFC)の細胞外noradrenaline (NA)とdopamine (DA)を測定した。基礎放出量を比較するとSHRのDAはWistar ratより有意に低値だったが、NAに有意差はなかった。MPH(1.0, 0.25, 0.1, 0.05mg/kg)の腹腔内投与によりWistar ratではNAが増加したが、SHRではMPH投与量が少なくなるに従いNAが減少した。MPH(100, 10, 1nM)をmPFCへ局所投与すると、Wistar ratではNAに変化がなかった。

が、SHR では低濃度 MPH により NA が減少した。DA は Wistar rat, SHR ともに MPH 投与により著明な変化は受けなかった。以上により、MPH 投与により Wistar rat では mPFC での NA が増加したが、SHR では低濃度 MPH で NA が減少することが分かった。過去の先行研究では Wistar rat, SHR ともに MPH を大量に投与すると脳内 NA が増加する事が知られているが、今回はじめて低量の MPH が SHR の mPFC において NA を減少させる事が明らかとなった。この MPH に対する反応性の違いが ADHD の病因と関連するものと思われる。

### B33. アルコールは脳内セロトニン放出増加によりストレスを緩和する

永田瑞生<sup>1</sup>, 西山敦子<sup>2</sup>, 大和孝子<sup>2</sup>, 小畑俊男<sup>3</sup>, 青峰正裕<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>中村学園大学大学院栄養科学研究科, <sup>2</sup>同 栄養科学部, <sup>3</sup>奥羽大学薬学部)

【目的】本研究では糖尿病ラットと健常ラットを用い、アルコール三種類 (エチルアルコール [EtOH], メチルアルコール [MeOH], イソプロパノール [IPA]) の脳海馬におけるセロトニン (5-HT) 放出への影響を調べ、さらに運動量に及ぼす影響も検討した。【方法】EtOH 投与後の行動量を測定し、そのときの 5-HT 放出の変化を腹腔内投与 (0.5-2.0g/kg) と脳内灌流 (25-200mM) 実験において調べた。また EtOH 以外のアルコール (MeOH, IPA) が 5-HT 放出量に及ぼす影響も脳内灌流 (各 100mM) により調べた。【結果と考察】EtOH 投与後の行動量は濃度依存性に有意に減少したが、5-HT 放出量は有意に増加した。脳内灌流でも同様の結果が得られた。また、三種のアルコールの 5-HT 放出量を比較したところ健常ラットでは炭素数、水素数が多いほど 5-HT 放出増加量は有意に減少していたが、三種のアルコール間での差違はみられなかった。以上の結果より、アルコール類の 5-HT 放出増加には炭素数および水素数が関与している可能性が示唆された。またアルコール摂取量が多いほど 5-HT 放出量を増加することにより不安解消、気分鎮静化に及ぼす効果が大きいことが示唆された。一方糖尿病ラットはアルコール感受性が低下している可能性が考えられた。

### B34. リドカインによるラット脊髄膠様質の TRPA1 活性化を介したグルタミン酸放出促進

朴 蓮花, 藤田亜美, 岳 海源, 井上将成, 水田恒太郎, 八坂敏一, 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))

ラット後根神経節ニューロンの transient receptor po-

tential (TRP) チャンネルが局所麻酔薬により活性化されることが報告されているが、この活性化が中枢神経系で見られるかどうか不明である。この点を検討するために、成熟ラットの脊髄スライスの後角第 II 層 (膠様質) ニューロンにホールセル・パッチクランプ法を適用し、局所麻酔薬がグルタミン酸作動性の興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。調べたニューロンの 56% でリドカインは濃度依存性に自発性興奮性シナプス後電流 (EPSC) の振幅を変えずに発生頻度を増加させた。この作用はリドカインの繰り返し投与によっても見られた。リドカイン作用は TRP 阻害薬ルテニウムレッドにより抑制されたが、TRPV1 阻害薬カプサイジンや Na<sup>+</sup> チャンネル阻害薬テトロドトキシンは作用しなかった。TRPA1 作動薬アリルイソチオシアネートが自発性 EPSC の発生頻度を増加させるニューロンでは、リドカインも増加作用を示した。テトラカインも興奮性シナプス伝達を促進する一方、プロカインやロビバカインは自発性 EPSC の振幅や発生頻度を減少させた。以上より、リドカインは膠様質の神経終末に存在する TRPA1 チャンネルを活性化してグルタミン酸放出を促進することが示唆される。今後、局所麻酔薬のどんな化学構造が TRPA1 チャンネルの活性化に重要であるか明らかにする必要がある。

### B35. ラット脊髄後角膠様質細胞の多面的分類とソマトスタチン作用

八坂敏一<sup>1,2</sup>, S.Y.X. Tiong<sup>2</sup>, D.I. Hughes<sup>2</sup>, J.S. Riddell<sup>2</sup>, A.J. Todd<sup>2</sup>, 藤田亜美<sup>1</sup>, 熊本栄一<sup>1</sup> (佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学), <sup>2</sup>グラスゴウ大学生物医学生命科学研究所脊髄グループ)

脊髄後角膠様質は侵害受容線維が終止するため痛み研究の標本として広く用いられている。今回、膠様質細胞を活動電位発火パターン、形態、含有伝達物質、神経修飾物質への応答を指標として分類した。含有伝達物質と形態を比較すると、islet cell は全て抑制性であったが、central, vertical, radial cell には抑制性と興奮性が混在していた。しかし、多くの vertical cell は興奮性であり、大型の一例を除く全ての標準型 radial cell も興奮性であった。活動電位発火パターンと含有伝達物質では、興奮性細胞の多くが A 型カリウム電流の関与する発火パターンを示したのに対し、抑制性細胞の多くは持続性発火を示した。神経修飾物質への応答と含有伝達物質では、ノルアドレナリンとセロトニンに対する応答は、興奮性細胞と抑制性細胞の両方で観察されたが、ソマトスタチンによる膜過分極性応答は抑制性細胞でのみ観察された。脊髄後角内においてソマトスタチン産生細胞は興奮性であり、これらの細胞がソマトスタチンを分泌して抑制性細胞を抑制し、脱抑制を起している可

能性が示唆された。また興奮性細胞の多くがA型カリウム電流関連発火パターンを示したことから、中枢性感作に関与するERKがこのチャンネルをリン酸化することでソマトスタチン分泌をトリガーしている可能性があり、この回路の痛覚異常への関与が示唆された。

### B36. ラット脊髄前角ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼすP2XおよびP2Y活性化の効果

青山貴博, 古賀秀剛, 中塚映政, 藤田亜美, 八坂敏一, 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))

脊髄損傷の急性期に生じる遅発性神経細胞死にATP受容体の関与が指摘されているが、その詳細は不明である。今回、ラット脊髄横断スライスの前角細胞にホールセル・パッチクランプ法を適用しATP受容体機能の詳細を調べた。膜電位を $-70\text{mV}$ に固定してATP $\gamma\text{S}$  ( $100\mu\text{M}$ )を灌流投与すると、60%の細胞で内向き膜電流、また、70%の細胞で自発性興奮性シナプス伝達の促進が見られ、これらの作用はいずれも濃度依存性であった。Na<sup>+</sup>チャンネル阻害薬テトロドトキシン存在下では、前者の作用は影響を受けなかったが、後者の作用は消失した。内向き膜電流が見られた細胞にP2Y受容体作動薬2-methylthio ADPを投与すると、ATP $\gamma\text{S}$ と同様に内向き膜電流が誘起され、また、ATP $\gamma\text{S}$ 誘起内向き膜電流はP2Y<sub>1</sub>受容体拮抗薬MRS2179により抑制された。一方、P2X受容体作動薬( $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATPやBzATP)は内向き膜電流を誘起しなかったが、 $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATPは自発性興奮性シナプス伝達を促進した。以上より、脊髄前角細胞において、P2X受容体の活性化は活動電位発生を伴う興奮性シナプス伝達の促進を、P2Y<sub>1</sub>受容体の活性化は膜を直接脱分極することが明らかになった。このようなATP受容体の活性化が遅発性神経細胞死に寄与することが示唆された。

### B37. アドレナリン $\alpha_2$ 受容体作動薬のデクスメドミジンによる蛙坐骨神経複合活動電位抑制

小杉寿文<sup>1,2</sup>, 水田恒太郎<sup>1</sup>, 藤田亜美<sup>1</sup>, 上村聡子<sup>1</sup>, 八坂敏一<sup>1</sup>, 熊本栄一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>佐賀大学医学部生体構造機能学講座 (神経生理学), <sup>2</sup>佐賀県立病院好生館緩和ケア科)

アドレナリン $\alpha_2$ 受容体作動薬デクスメドミジン(DEX)は脊髄レベルで鎮痛作用を有し、末梢神経レベルで局所麻酔薬の作用を増強することが報告されている。また、DEX自身による神経伝導遮断が考えられているが、その詳細は不明である。殿様蛙坐骨神経にair-gap法を適用し、DEXなどのアドレナリン受容体作動薬や局所麻酔薬テトラカインが複合活動電位(CAP)に及ぼす作用を調べた。

DEXは可逆的かつ濃度依存的にCAPの振幅を減少させた( $\text{IC}_{50}=0.40\text{mM}$ )。DEXの効果はヨヒンビンやアチバメゾールで拮抗されず、アチバメゾールそれ自体にCAP抑制作用があった。他のアドレナリン $\alpha_2$ 受容体作動薬(クロニジンやオキシメタゾリン)も抑制効果を認めた。一方、アドレナリン、ノルアドレナリン、 $\alpha_1$ 作動薬フェニレフリンおよび $\beta$ 作動薬イソプロテレンール(各 $1\text{mM}$ )はCAPに作用しなかった。テトラカインは可逆的にCAPの振幅を減少させた( $\text{IC}_{50}=0.014\text{mM}$ )。以上より、DEXは、テトラカインより約30倍効果が小さいが、 $\alpha_2$ 受容体の活性化を介さずに伝導遮断を起こすことが明らかになった。他の $\alpha_2$ 受容体作動薬であるオキシメタゾリンやクロニジン、あるいは $\alpha_2$ 受容体拮抗薬アチバメゾールも伝導遮断効果を示すことから、これらの $\alpha_2$ 薬に共通する化学構造が神経伝導遮断に関与することが示唆された。

### B38. マウス鼓索神経における甘味物質応答のNaCl混合による影響

大栗弾宏<sup>1</sup>, 安松啓子<sup>2</sup>, 二ノ宮裕三<sup>1</sup> (<sup>1</sup>九大院・歯・口腔機能, <sup>2</sup>朝日大・歯・口腔機能修復)

甘味は、苦味によって抑制されるなど、他の味質との相互作用することが知られている。これまでに我々は、マウス甘味応答の苦味物質キニーネによる抑制にTRPM5を介する細胞内伝達経路が関与することを明らかにしてきた。本研究では、もう一つの修飾作用を示す候補である塩味についての解析を行った。C57BL/6マウスの鼓索神経を麻酔下で剖出し、糖類、人工甘味料、グルコース重合体、甘味を呈するアミノ酸、糖アルコールおよびそれらにNaClを混合した溶液を舌に与え、全神経線維束の応答を記録した。また、混合液にNa抑制物質であるアミロライドを加えた応答ならびに甘味抑制物質であるグルマリンの舌処理前後での応答を比較した。その結果、人工甘味料、グルコース重合体を除いた甘味物質においてNaCl混合により増大を示すことがわかった。特にGlc応答の増大は他の甘味物質と異なり、アミロライドによる抑制、あるいはグルマリンによる抑制、またグルマリン後のアミロライド混合においても増大に抑制が起らず、甘味情報伝達関連分子TIR3やTRPM5欠損マウスにおいても増大を示していた。このことから、マウスの甘味応答は末梢レベルで塩味による修飾を受けるが、その特性は甘味物質によって異なり、Glc応答のNaClによる増大にアミロライド非感受性成分、グルマリン非感受性成分を介する経路やトランスポーターが関与することが示唆された。

### B39. マウス鼓索神経性減後の再生過程でみられるうま

## 味応答における回復

楠原庸子<sup>1,2</sup>, 安松啓子<sup>3</sup>, 大栗弾宏<sup>1</sup>, 堀尾奈央<sup>1</sup>, 前田勝正<sup>2</sup>, 二ノ宮裕三<sup>1</sup> (九州大学大学院・歯学研究院・口腔機能解析学分野,<sup>2</sup>九州大学大学院・歯学研究院・歯周疾患制御学分野,<sup>3</sup>朝日大学・歯・口腔機能修復・口腔生理)

うま味の受容体候補として T1R1/T1R3 ヘテロダイマーのみであるという主張と、複数存在するという主張がある。本研究では、マウス鼓索神経 (CT) 再生過程のうま味応答の回復を調べた。CT 挫滅 3, 4, 5 週後のグルタミン酸, グルタミン酸にイノシン酸, mGluR1,4 アンタゴニストを加えた溶液, mGluR1,4 アゴニストに対する全神経線維束応答を無処置マウスと比較した。CT 再生 3 週でグルタミン酸応答が見られ, その応答は AIDA (mGluR1 アンタゴニスト) や CPPG (mGluR4 アンタゴニスト) で有意に抑制された。CT 再生 4 週でグルタミン酸+イノシン酸での相乗作用の応答が見られたが, mGluR1,4 アゴニスト+イノシン酸の相乗作用の応答は CT 再生 5 週以降に回復した。これらの結果から, T1R1/T1R3, mGluR1,4 を持つ味細胞の機能は神経再生時に時期をずらしながら回復し, マウス茸状乳頭では複数のうま味受容体が存在することが示唆された。

## B40. 甘味抑制物質ギムネマ酸のヒト甘味受容体に対する相互作用部位

實松敬介<sup>1,2</sup>, 重村憲徳<sup>1</sup>, 上瀧将史<sup>1</sup>, 中村誠司<sup>2</sup>, 井元敏明<sup>3</sup>, 二ノ宮裕三<sup>1</sup> (九大院・歯・口腔機能,<sup>2</sup>九大院・歯・顎顔面腫瘍,<sup>3</sup>鳥取大・医・統合生理)

ギムネマ酸は植物ギムネマ・シルベスタ由来のトリテルペン配糖体であり, ヒトおよびチンパンジーの甘味を強力に抑制し, マウスには無効であることが知られている。本研究では, 甘味受容体 T1R2/T1R3 再構築系を用いて, ギムネマ酸と甘味受容体との相互作用部位の同定を試みた。その結果, ギムネマ酸はヒト T1R2/T1R3 の甘味応答を抑制したが, マウス T1R2/T1R3 は抑制せず, ギムネマ酸がヒト T1R2/T1R3 に直接作用することが示唆された。次に, T1R2/T1R3 のヒト/マウス異種間の組み合わせおよびキメラを用いた解析から, ギムネマ酸感受性にはヒト T1R3 の膜貫通ドメインが主に重要であることが示唆された。さらに, 点変異を用いた解析では, ギムネマ酸感受性に影響を与えるアミノ酸残基の存在を認めた。ドッキングシミュレーション解析では, ギムネマ酸がヒト T1R3 膜貫通ドメイン内の上記アミノ酸残基を含む結合ポケットに収まることが予測された。よって本研究により, ギムネマ酸がヒト T1R3 の膜貫通ドメインに作用する可能性が示唆された。