

第 61 回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成 21 年 11 月 21 日（土），22 日（日）
 会 場：山口大学医学部霜仁会館（そうじんかいかん）
 当番幹事：山口大学大学院医学系研究科 小林 誠，中村彰治

第 61 回中国四国地方会は 60 名の参加者を得て，21 日の 13 時 45 分からの開会挨拶に引き続き，13 時 50 分より 18 時近くまで，更に，翌日 22 日の 9 時 30 分から正午近くまで，合計 23 演題の発表が行われました。今回は，地方会活性化と参加者の交流促進のために 2 日間での開催とし，21 日の夜に懇親会を行いました。前回の第 60 回中国四国地方会において試行されました，若手による研究振興を目的とした奨励賞は，IUPS と同時に開催されました日本生理学会総会で，最終的な承認が得られ，本地方会から日本生理学会公認の地方会奨励賞となりました。5 名の候補者による研究発表が行われ，厳正なる審査が行われた結果，山口大学医学部医学科 4 年生（学部学生）中島彰子氏，愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学高橋寿明氏の 2 名が受賞し，懇親会の場において表彰されました。また，本地方会に先立ちまして，21 日 11 時 50 分から行われました評議員会でも多くの議論があり，2 日間開催と懇親会について，本地方会の活性化につながると大いに期待しているとの意見が出されました。このように有意義に地方会が開催できましたのも，参加者皆様のご協力ご支援の賜と感謝しております。第 62 回中国四国地方会は，鳥根大学・医学部・環境生理学の紫藤 治教授が中心になって開催されることになりました。

奨励賞対象演題

1. フォーカスド・プロテオミクスによる血管平滑筋の異常収縮に関する新規リン酸化タンパク質の探索

中島彰子¹，岸 博子²，川道穂津美²，加治屋勝子²，高田雄一²，徳森大輔²，小林 誠²（¹山口大学医学部医学科 4 年生（学部学生），²山口大学大学院医学系研究科器官制御医学講座生体機能分子制御学）

致死的血管病を急性発症させる血管攣縮の本態は，血圧維持を担う血管平滑筋の Ca^{2+} 依存性の生理的収縮とは異なり， Ca^{2+} 非依存性の異常収縮である。その分子機構として，我々は，スフィンゴシルホスホリルコリン（SPC） \rightarrow Fyn \rightarrow Rho キナーゼ経路を見出したが，Fyn \rightarrow Rho キナーゼ間の仲介分子は未だ不明である。本研究ではその新規シグナル分子の探索を試みた。Fyn はチロシンキナーゼであるので，その下流分子はチロシンリン酸化タンパク質であるが，本来，低レベルであるリン酸化反応の中でもチロシンのリン酸化率は特に低く僅か数%以下である。そこで今回，フォーカスド・プロテオミクスを用いて，血管平滑筋細胞の SPC 刺激によってチロシンリン酸化されたタンパク質を濃縮したサンプルを得，リニアイオントラップ・タンデム型質量分析計 4000QTRAP で解析した。その結果，電気泳動されたチロシンリン酸化タンパク質の 59 本のバンド

の内，16 本のバンドより 21 種類の新規タンパク質の検出に成功した。リン酸化ペプチドは非リン酸化ペプチドに比べてイオン化効率が低いため，リン酸化タンパク質の質量分析は困難とされる現状の中，非常に高い検出率を得ることができた。今後，今回同定した候補タンパク質の機能解析を行う予定である。フォーカスド・プロテオミクスは，ごく微量であっても重要な未知のシグナル分子探索に有効な手段であることがわかった。

奨励賞対象演題

2. 光学的膜電位長時間連続測定法の *in vivo* ラット運動感覚野への適用と単一掃引記録した神経活動の定量解析

濱 徳行，伊藤眞一，廣田秋彦（鳥根大学医学部神経・筋肉生理学講座）

非常に多数の領域から神経活動を同時記録する方法の一つとして，光学的膜電位測定法が普及しつつある。しかし，市販の測定装置では加算処理によるシグナル・ノイズ比（SN 比）の改善が必須であるため，適用可能な実験系が限定されてしまっているのが現状である。我々は，単一掃引でも充分定量的に解析できる高 SN 比のデータを長時間連続して記録可能な測定システムの開発を進めている。*in vivo* 測定で最も大きなノイズは心拍動に由来するものであ

るが、心周期に同期して似た形状の波形が繰り返される為、アーティファクト波形を正確に推定出来ればこれを差し引くことで除去できる。しかし、長時間連続記録にこれまでの手法を単純に適用しても、アーティファクトを十分に除去することはできなかった。その大きな要因として、一般的には動物の呼吸を一時的に止めて測定しているが、長時間連続記録では自発呼吸下で測定するため、心周期に呼吸性変動が生じ、アーティファクトの形状が変化することが考えられる。形状の変化を詳細に検討した結果、心電図のR波の立ち上がりを中心とする前後半周期に限ると、心周期の変動にかかわらずほぼ一定であることが明らかになった。我々はこの前後半周期のみを用いてアーティファクト波形を推定するソフトウェアを開発し、心拍動由来のアーティファクトを大部分除去することに成功した。この測定法の適用例として、ラット運動感覚野のBaclofen投与による刺激応答時の神経活動の変化についての実験結果も併せて報告する。

奨励賞対象演題

3. TRPA1 contributes to activation of the muscle reflex

○S. Koba^{1,2}, SG. Hayes², LI. Sinoway² (¹Division of Integrative Physiology, Tottori University Faculty of Medicine, ²Penn State Heart & Vascular Institute)

This study was undertaken to elucidate the role played by transient receptor potential A1 channels (TRPA1) in activating the muscle reflex, a sympathoexcitatory drive originating in contracting muscle. First, we tested the hypothesis that stimulation of the TRPA1 located on muscle afferents reflexly increases sympathetic nerve activity (SNA). In decerebrate rats, allyl isothiocyanate (AITC), a TRPA1 agonist, was injected intra-arterially into the hindlimb muscle circulation. This led to a 33% increase in renal SNA (RSNA). The effect of AITC was a reflex because the response was prevented by sectioning the sciatic nerve. Second, we tested the hypothesis that blockade of TRPA1 reduces RSNA response to contraction. 30-s continuous static contraction of the hindlimb muscles, induced by electrical stimulation of the peripheral cut ends of L4 and L5 ventral roots, increased RSNA and blood pressure. The integrated RSNA during contraction was reduced by HC-030031, a TRPA1 antagonist, injected intra-arterially (163±24 vs. 95±21 arbitrary units; before vs. after HC-030031; P<0.05). Third, we attempted to identify potential endogenous stimulants of TRPA1, responsible for activat-

ing the muscle reflex. Increases in RSNA in response to injection into the muscle circulation of arachidonic acid, bradykinin, and diprotonated phosphate, which are metabolic by-products of contraction and stimulants of muscle afferents during contraction, were reduced by HC-030031. These observations suggest that the TRPA1 located on muscle afferents is part of the muscle reflex, and further support the notion that arachidonic acid metabolites, bradykinin, and diprotonated phosphate are candidates for endogenous agonists of TRPA1. Supported by American Heart Association Beginning Grant-in-Aid 08654160D (S. Koba).

奨励賞対象演題

4. 起立動作時における予測的な脳血流量、総頸動脈血流速の変化

北岡和義¹, 三浦 哉², 北村光夫¹, 稲垣明浩¹, 芥川正武³, 木内陽介³, 吉崎和男¹ (¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部生理機能学分野, ²徳島大学大学院ソシオ・アンド・アーツ・サイエンス研究部応用生理学研究室, ³徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部ライフシステム部門)

臥位から立位など体位の変動を伴う動作は、重力方向の変化を伴い血流動態に起立性の影響を与える。このような起立動作は特に成長期や老年期において、一時的な脳虚血によりめまい、失神を引き起こす起立性低血圧症を伴うことが知られている。我々は起立時の血流動態において動作に先行するフィードフォワード的な調節機構が姿勢調節機構などと同様に存在し、その不調が起立性低血圧症の原因のひとつになっているのではないかと仮説した。そして以前にドップラー頸動脈血流計測装置を用いた総頸動脈血流速度の記録を行ない、起立動作の直前に最大血流速度の低下が認められることを報告した。しかし、頸動脈血流速度の変化が起立性低血圧症に直接関連する脳血流量にどのような影響を与えているかは明らかではない。そこで、本研究では近赤外線分光装置 (Near-Infrared Spectroscopy; NIRS) を用いて、起立動作に先行する脳血流量の変化を検討することを目的とした。

健康な成人男性6名に対し、予告刺激を伴う起立動作時での前頭部位の酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン、総ヘモグロビン変化量、および総頸動脈血流速度の記録、解析を行った結果、起立動作を行う直前に酸素化ヘモグロビンに有意な増大が認められた。総ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビンにおいては有意な変化は認められな

かった。また、総頸動脈血流速度においては先行研究と同様に起立直前に最大血流速度の減少が認められた。これらの結果から起立動作に先行する予測的な脳血流量の変化が存在する可能性が示唆された。

奨励賞対象演題

5. 膠芽腫由来腫瘍幹細胞の造腫瘍能と幹細胞性獲得機構

高橋寿明^{1,3}, 井上明宏², 原田広信², 矢野 元^{1,3}, 大西丘倫², 田中潤也^{1,3} (1愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学, 2愛媛大学大学院医学系研究科脳神経病態外科学, 3愛媛大学プロテオ医学センター神経部門)

近年、腫瘍の増大・再発に腫瘍中にわずかに存在する腫瘍幹細胞が大きな役割を果たしていることが明らかとなってきた。しかし腫瘍幹細胞の発生活起源や腫瘍形成過程においてどの様な役割を担っているのか不明な点が多い。今回、私達はヒト膠芽腫細胞株 (U251) から誘導した腫瘍幹細胞 (Sphere 細胞) を用いて、腫瘍増大への関与について検討した。

U251, Sphere 形成細胞 (1×10^6) をヌードマウスの皮下に移植すると、両細胞共に皮下腫瘍を形成する。腫瘍体積は Sphere 細胞の方が大きいにもかかわらず、U251 細胞由来の腫瘍中心部は面積の約 70% が壊死を起こしていたのに対し Sphere 細胞由来の腫瘍では約 20% であった。免疫組織染色により腫瘍血管を観察したところ、壊死の度合いは腫瘍血管の数に依存することが明らかとなった。そこで血管新生に関わる遺伝子の発現を RT-PCR により検討したところ、Sphere 細胞では転写因子 HIF-1 (低酸素誘導因子) および HIF-1 の標的遺伝子である VEGF (血管内皮増殖因子) や HGF (肝細胞増殖因子) の発現が U251 に比べて亢進していた。

腫瘍組織内部は正常組織に比べ低酸素状態であり、癌細胞がその栄養状態の悪い環境下で生き延びるには血管新生が必須である。今回の結果から、腫瘍幹細胞が HIF-1 を介した血管新生を積極的に誘導することで腫瘍増大に関与していることが示唆された。ところで上述したように腫瘍幹細胞の起源については不明な点が多い。現在私達は腫瘍幹細胞性の獲得に必要な因子の探索も行っているので、併せて紹介したい。

6. 灸刺激が循環調節系に及ぼす影響

日隈眞理子, 遠藤加菜, 若杉理恵, 門脇章人, 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)

WHO の鍼灸療法への指針は、鍼灸が自律神経や循環系

に影響を及ぼすことを示唆しているが、そのエビデンスは未だ解明の途中にある。本研究は、下肢部灸刺激に伴う末梢情報が循環調節系に作用するメカニズムを検討することを目的とした。ヒトにおいて ($n=8$), 温筒灸 (灸療用法) による灸刺激を下肢の経穴 (ツボ) 又は非経穴 (非ツボ) に行う、あるいは灸煙のみを匂わせた。仰臥位で Rest5 分、灸刺激 8 分、Recovery5 分間施行し、平均動脈血圧 (MAP), 末梢血管抵抗 (TPR), 心拍数 (HR) 及び心拍出量 (CO) を測定した。経穴への灸刺激は $MAP(4 \pm 1 \text{ mmHg})$ 及び TPR ($0.06 \pm 0.03 \text{ mmHg/mL/min}$) を有意に低下させたが、HR 及び CO への影響はなかった。非経穴への灸刺激及び灸煙のみでは有意な循環動態の変化を認めなかった。次に、麻酔下ラット ($n=8$) においてヒトでの応答が再現可能であるか否かを調べ、更に施灸に伴う腎交感神経活動 (RSNA) の応答を直接的に検討した。ヒト経穴に相当する後肢部への灸刺激は RSNA ($26 \pm 8\%$) や MAP ($9 \pm 4 \text{ mmHg}$) を減少させた。この応答は坐骨及び大腿神経の切断により消失した。また非経穴部の灸刺激及び灸煙のみでは、有意な RSNA や循環動態の変化はヒトの場合と同様に見られなかった。以上の結果から、経穴部への灸刺激は交感神経活動の反射性抑制を介して末梢血管を拡張させ動脈血圧の低下を引き起こすことが判明した。

7. 意識下ネコにおける筋機械受容器反射に対する心不全の影響

若杉理恵, 門脇章人, 朝日梨恵, 平林美里, 折田直哉, 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)

心不全患者の運動時には交感神経活動が過活性し血管収縮が起こり、活動筋への血流供給が制限されると言われている。この交感神経活動の過活性をもたらすメカニズムの一つとして、筋機械受容器反射は麻酔下や除脳下動物において亢進するという仮説が研究されてきた。しかし、意識下動物についてはよく分かっていない。そこで、本実験では覚醒ネコを用いて、下腿三頭筋ストレッチ時における筋機械受容器反射を介した心拍数、血圧の調節に対する心不全の影響を調べることを目的とした。更に、音ストレスを用いて心不全がストレスに対する高位中枢から発する心血管系反応に影響するか否かを調べた。実験プロトコルとして、①下腿三頭筋のストレッチ (股関節および膝関節を伸展させた状態から更に足関節を 30 秒間背屈させる), ②音ストレス (ホワイトノイズ (92-95dB) を 1 分間) を実施した。Intact 条件においてデータ取得後、麻酔下で左冠動脈前下行枝を結紮し心筋梗塞を作成した。心筋梗塞後は 1 週間以上の回復期間を設けたあと、同様の条件で 3 か月にわ

たって実験を繰り返した。下腿三頭筋ストレッチによる昇圧応答は、心筋梗塞後46週以降に増大した。一方、ホワイトノイズによる昇圧応答は心筋梗塞後1-3週以降に減弱した。また、音ストレスに対する心拍数の増加も心不全により低下する傾向がみられた。以上の結果は、心不全が筋機械受容器反射による昇圧応答を亢進させるが、ストレス時における高位中枢からの昇圧応答を減弱させることを明らかにした。また、筋ストレッチと音ストレスに対する心不全の影響が異なったことから、心不全は循環調節の遠心路は影響せず、中枢もしくは受容器に変化をもたらしたと考えられる。

8. 薬物誘導による心臓へのNCX1高発現モデルの開発

岩崎慶一郎¹、片野坂友紀¹、毛利 聡^{1,2}、成瀬恵治¹
(¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科システム生理学、²川崎医科大学生理学1)

心筋細胞の形質膜や筋小胞体には、多数のCa²⁺輸送体が発現しており、心筋細胞でみられる収縮・弛緩、細胞分化や肥大応答等の生理機能は、これらのCa²⁺輸送体が担う緻密なCa²⁺ハンドリングによって維持されている。これらのCa²⁺輸送体のうち、Na⁺/Ca²⁺交換体(NCX1)は、心臓の拍動ごとに流入してくるCa²⁺を、細胞膜を介したNa⁺の濃度勾配を利用して細胞外へと汲み出す実質上唯一のCa²⁺排出系として働くことが知られている。これまでの研究より、心肥大発症において、心筋細胞でのNCX1発現量が亢進することが報告されており、この現象は上昇した細胞内Ca²⁺濃度に対する適応応答として考えられている。しかしながら、NCX1は状況に応じてCa²⁺流入系としても機能する可能性があるために、発現量が亢進されることによって、むしろ増悪因子として働く可能性も否定できない。我々は、心肥大や心不全発症におけるNCX1の病態生理的役割を検討するために、薬物投与により心臓でのNCX1発現量を調節することが可能なトランスジェニックマウスを作製した。薬物投与後、Na⁺/K⁺ATPaseや筋小胞体Ca²⁺ATPaseの発現量には変化が見られなかったが、心臓でのNCX1の発現量が約3倍上昇することが確認できた。本研究では、このトランスジェニックマウスを用いて、心臓および心筋細胞の形態的特徴、Ca²⁺輸送体の分子発現や活性、および心機能に関して報告する。さらに、肥大応答や心不全発症から進展に至る過程におけるNCX1の役割を検討するための新しいモデル動物としての可能性を議論する。

9. 短鎖トリグリセライドが覚醒下イヌの胃腸運動に及ぼす影響

逢坂和昌^{1,4}、古川直裕²、畑野瑞恵³、徳田雅明¹(¹香川大学医学部細胞情報生理学、²川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科、³川崎医科大学生理学1、⁴株式会社伏見製薬所)

短鎖トリグリセライドの上部消化管投与が消化管運動に及ぼす影響については、あまり検討されていない。以前に短鎖トリグリセライドの一つであるトリアセチンが、覚醒下イヌの胃排出を遅らせることを報告し、トリアセチンが上部消化管の運動に影響を及ぼしている可能性を示した。今回は、トリアセチンの胃内投与が胃近位部の受入れ容量と胃前庭部及び十二指腸の運動に与える影響を検討した。ビーグル犬に、慢性的に胃ろう管、および胃前庭部と十二指腸にフォーストランスジューサを装着した。覚醒下にて、胃ろう管より胃近位部に伸展用バックを挿入し、パロスタットに接続した。パロスタットを用いて胃近位部を一定圧(5mmHg)で伸展し、測定開始から5分後に、トリアセチン溶液(1%、2%)および温水20mlを胃内へ投与し、その後10分間測定を続けた。なお、実験は空腹期と、食後期の両者の相で行った。トリアセチンの胃内投与により、直後から胃近位部容量の増加が認められた。胃前庭部の運動は、2%トリアセチンにより一過性に抑制されたが、その他では一定の変化を示さなかった。一方、十二指腸の運動は、投与直後から10分間にわたり亢進した。この効果パターンは、空腹期と食後期で差がなかった。トリアセチンの胃内投与は胃近位部、遠位部、および十二指腸の運動に異なる効果を及ぼすし、排出遅延を生じさせることが明らかとなった。

10. 覚醒ラットを用いた外側膝状体電気刺激による人工的光知覚の行動学的評価

久保悠介¹、下釜由貴奈²、佐々木 仁³、赤碕孝文⁴、畠義郎¹(¹鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体高次機能学、²鳥取大学医学部生命科学科神経生物学、³大阪大学大学院医学系研究科情報生理学、⁴京都産業大学コンピュータ理工学部メカトロニクス)

視機能の再建を目指す視覚の補綴装置が広く研究されているが、その基本的な考えは、視覚経路を人工的に刺激することで光知覚を誘発するというものである。

それらは刺激部位により、網膜刺激型、皮質刺激型そして外側膝状体(LGN)刺激型に分類される。網膜刺激型では視野の特定箇所に対応する網膜部位を容易に刺激できるという利点があるが、一方で網膜はとても脆弱で装置の埋め込みは危険であり、さらに網膜や眼を失った場合にはこの方式は適用することができない。皮質刺激型は眼球を失った場合にも適用できるが、また別の問題がある。視覚

野のある部位は、網膜部位に加えて刺激の方位や両眼性をも表現するために、刺激箇所を微妙なずれによって全く異なった知覚を生じさせる可能性がある。しかし、LGNは網膜地図を持ち、そのニューロンは網膜神経節細胞様のシンプルな受容野を持つため、LGN刺激型は上で述べた諸問題を解決することができるかも知れない。

本研究ではLGN電気刺激が視知覚を生じるかどうかを、げっ歯類を用いた行動学的実験により検討した。ラットを閃光刺激を条件刺激として用いた能動的回避学習課題で訓練した後、閃光刺激のかわりにLGNへ電気刺激を与えたところ、回避反応が観察された。より強いLGN電気刺激は、より高い回避率とより短い反応潜時を導いた。これらの結果はげっ歯類においてLGN電気刺激は視知覚を生み出しうることを示唆している。

11. シナプス伝達を阻害した視覚野に見られる経験依存的な入力軸索の退縮

島 義郎, 渡邊佳奈, 森島 佑, 樋川正仁 (鳥取大学大学院医学系研究科機能再生医科学専攻生体高次機能学)

発達期の大鼠皮質視覚野では、片眼遮蔽によって皮質ニューロンは遮蔽眼への反応性を失い、外側膝状体からの入力軸索のうち遮蔽眼入力を伝える軸索が退縮する。この時、皮質ニューロンの活動をGABA受容体作動薬により抑制すると、健常眼入力を伝える軸索が退縮する。この実験系では、皮質ニューロンは抑制されているが、入力軸索の電気活動や伝達物質放出は抑制されていない。従って、局所的なシナプス伝達が寄与している可能性がある。その検証のため、ボツリヌス毒素E型(BoNT/E)を皮質に投与することで神経伝達物質の放出を阻害し、入力軸索の退縮が起こるかどうかを観察した。

発達期のネコ視覚野にBoNT/Eを投与するとともに、外側膝状体から皮質への投射軸索を標識した。一群の動物では両眼の視覚遮断を行った。1週間後、神経活動が抑制されている皮質領域を電気生理学的に特定した。活動が抑制されていた領域に分布していた入力軸索を3次元的に再構成して、その形態を定量的に評価した。

その結果、視覚入力を阻害しない動物では、両眼遮蔽動物と比較して、入力軸索は顕著な退縮を示した。従って、シナプス伝達を阻害した条件でも、視覚入力により駆動される軸索退縮は起こることが明らかとなった。このことは、抑制視覚野に見られる視覚経験に依存した軸索退縮は、シナプス伝達を必要とせず、シナプス前性のメカニズムによることを示している。

12. 運動開始時に先行する前頭前野局所脳血流量の増加

大谷 遼, 石井 圭, 梁 楠, 若杉理恵, 門脇章人, 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)

運動初期における循環反応は、運動を見越した高位中枢からのフィードフォワード制御(セントラルコマンド)による反応だと考えられる。そこで本研究では、運動に先行する脳活動によって循環応答が生じると仮定し、以下の条件で30秒間の自転車エルゴメータ運動(50rpm)を行った。①機械のアシストによる他動的運動、②被験者の任意のタイミングで開始する自発的運動、③外部からの刺激(検者の声かけ)で急速に開始する自発的運動(①②の負荷量は、男性100wおよび150w・女性60wおよび100wの2種類とした)。男性6名・女性6名の被験者を閉眼背臥位におき指先連続血圧計(Finometer)を用いて血圧・心拍数等を測定した。さらに、近赤外線分光計(NIRO300)を用いて被験者の前頭前野における酸素化ヘモグロビン(O₂Hb)濃度変化を計測し、運動開始時における循環応答との関係を調べた。その結果、①他動的運動時に心拍数は軽度増加したが、O₂Hb濃度は減少した。②被験者が任意のタイミングで自発的に運動を開始した場合、運動開始前約10秒からO₂Hb濃度が増加し、運動開始前1~2秒から心拍数は増加した。③外部からの声掛け刺激で運動を開始する場合には、このような運動開始前の反応はみられなかった。以上の結果から、随意的運動では前頭前野ニューロン活動が運動開始にかなり先行して始まり心循環応答をフィードフォワード制御することが示唆された。

13. 重症脳傷害組織に集積するマクロファージ様細胞BINCsの脳保護作用を利用した新規治療法の試み

田中潤也^{1,3}, 高橋寿明¹, スミルキンアンナ¹, 矢野元¹, 井上明宏², 久門良明², 大西丘倫² (¹愛媛大学大学院医学系研究科分子細胞生理学, ²愛媛大学大学院医学系研究科脳神経病態外科学, ³愛媛大学プロテオ医学研究センター神経部門)

脳損傷や脳梗塞など重症脳傷害組織には、傷害後2日目よりマクロファージ様細胞が骨髄より侵入し激しく増殖する。この細胞群はIbalとNG2プロテオグリカンを発現しているのが特徴で、我々はBINCs(Brain Ibal+/NG2 Cells)と呼んでいる。ラット脳損傷あるいは脳梗塞モデルで脳傷害後48時間の時点で5FUを注射すると、その激しい増殖性のためにBINCs細胞死が誘導され、同時に組織傷害が拡大、ラットの個体死が頻発した。逆に、5FU投与により拡大した脳梗塞巣にBINCsを移植すると、組織傷害の拡大と個体死を顕著に抑制した。ラット脳梗塞組織から分離したBINCsは、IGF-1, HGF, BMP7などの神経保護的

因子 mRNA を発現していた。特に、IGF-1 の発現レベルは高く、免疫組織化学でも強い発現が確認できた。ヒト脳梗塞組織にも BINC s は存在し、IGF-1 の発現も認められた。これらの結果から、重症脳障害に対して BINC s の増殖活性化促進が新たな治療法になると考えられた。実際に BINC s の増殖活性化を誘導するサイトカイン混合物を皮下注射すると、ラット個体死が防がれ、脳喪失体積も顕著に縮小した。

今後、より広い脳・脊髄傷害モデルを用いて、BINC s を標的とする治療薬の効果を検討していく予定である。

14. *Scn1a* 遺伝子変異ラットを用いた抗てんかん薬の熱性けいれん抑制効果

林 桂一郎¹、大守伊織¹、西木禎一¹、真下知士²、芹川忠夫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、²京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設)

【目的】全般てんかん熱性けいれんプラス (GEFS+) は、6 歳を越えてなお生じる熱性けいれんとその後の無熱性けいれんを特徴とする神経疾患である。GEFS+ の原因遺伝子として電位依存性ナトリウムチャネル $\alpha 1$ サブユニットをコードする *Scn1a* 遺伝子が同定されており、GEFS+ 患者の 5-10% に *Scn1a* 遺伝子の変異が認められる。本研究では、*Scn1a* 遺伝子に変異を有する GEFS+ モデルラットを用いて各種抗てんかん薬の熱性けいれんに対する有効性を評価した。

【方法】実験には、*Scn1a* 遺伝子変異ラット (F344/NSlc-Scn1a^{Kyo811}) を用いた。このラットは、*Scn1a* 遺伝子にミスセンス変異を有しており、体温の上昇によってけいれんを起こすことが確認されている。このラットに 45℃ のお湯で熱刺激を与えけいれんを誘発した。発作誘発時体温、けいれん持続時間、けいれんの重篤度を測定し、各種抗てんかん薬 (バルプロ酸、カルバマゼピン、フェノバルビタール、ガバペンチン、ジアゼパム、トピラマート) の前処置によってそれらが抑制されるかどうかを検討した。

【結果・考察】対照群では全てのラットでけいれん発作が観察されたのに対し、ジアゼパムの前処置によって発作の発症が抑制された。また、カルバマゼピン及びガバペンチン投与群では、発作誘発時体温の低下を認めたが、その他の薬物では発作誘発時体温の上昇、けいれん持続時間の短縮、けいれん発作の軽症化が認められた。以上の結果より、このモデルラットは抗てんかん薬のスクリーニングに有用であると考えられる。

15. 低酸素/低グルコース刺激によって誘導される非ア

ポトーシス型細胞死の解析

青戸 守¹、新沢康英²、鈴木洋司¹、大久保信孝¹、満田憲昭¹、辻本賀英² (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大阪大学大学院医学系研究科遺伝医学講座遺伝子学)

低酸素や虚血によって誘導される細胞死のメカニズムは、いまだ十分に理解されていない。我々はこれまでに、低酸素/低グルコース刺激によって誘導される細胞死がアポトーシス実行因子である Caspase に依存しない非アポトーシス型細胞死であること、また、この細胞死がホスホリパーゼ A2 (PLA2) に依存することを報告してきた。また、前回、この細胞死において活性酸素種 (ROS) → p38 MAPK → PLA2 というシグナルが重要な働きをしていることを報告した。今回、ROS の下流で p38 MAPK の活性化に関わるリン酸化酵素 ASK1 が、この細胞死に関与するかどうかを検討した。その結果、ASK1 の siRNA によってこの細胞死が阻害されることや p38 MAPK や PLA2 の活性化が阻害されることがわかった。以上より、低酸素/低グルコース刺激によって誘導される非アポトーシス型細胞死において ASK1 が関与していると考えられる。

16. 絶食による体温低下と核内受容体 PPAR α との関係

清水紀之¹、近久幸子¹、小川真太郎²、勢井宏義¹ (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徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床栄養学分野)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) は脂肪酸をリガンドとする核内受容体スーパーファミリーの一種であり、エネルギー代謝制御や脂肪細胞の分化・増殖等に寄与している。我々は、PPARs のアゴニストであるベザフィブレートを経口投与が、絶食時のような体温低下を発生させることを確認した。PPARs には α 、 β/δ 、 γ の 3 つのサブタイプがあり、その中で PPAR α は主として脂質代謝促進に関連している。PPAR α の転写産物である Fibroblast growth factor 21 (FGF21) の過剰発現は冬眠のような体温低下を引き起こすことが報告されており、このことは PPAR α -FGF21 経路が体温低下と関連していることを示している。そこで今回の実験では、PPAR α ノックアウトマウスを用いて絶食時における体温低下と PPAR α の関連性について調べた。明暗周期 12 時間および環境温 26℃ の下、1 日目対照日、2 日目絶食日、3 日目再給餌日における体温変化を測定した。飼料の除去・再投与は各々 Zeitgeber time 1 で行った。その結果、PPAR α ノックアウトマウスでは、肝臓の FGF21 mRNA が発現していないにも関わらず、野生型マウスと同様の体温低下を示した。このこと

は FGF21 の発現は、通常的环境温度下での絶食による体温低下には関与しないことを示唆している。

17. 内在性核酸, 希少糖核酸, 核酸医薬品及びその誘導体の血管内皮細胞におよぼす影響について

塚本郁子¹, 榊原紀和⁴, 丸山徳見⁴, 窪田泰夫³, 徳田雅明², 小西良士¹ (¹香川大学医学部薬物生体情報学, ²香川大学医学部細胞情報生理学, ³香川大学医学部皮膚科学, ⁴徳島文理大学香川薬学部)

D-glucose の構造異性体は 24 種類あるが、その多くは自然界における存在が極めて少ない「希少糖」である。2000 年に、香川大学で希少糖の量産方法が確立されて以来、希少糖の生理作用の研究がすすめられているところであるが、その一環として血管内皮細胞の増殖や管腔形成能におよぼす効果を検討したところ、希少糖である D-allose のほか、D-ribose や 2-deoxy-D-ribose に抑制作用を見いだした。ribose 類がヌクレオシドの構成糖であり、ヌクレオシドのいくつものが抗がん剤、抗ウイルス剤として用いられていることは周知の事実である。

血管内皮細胞による管腔形成は、血管新生のモデル系として用いられる。血管新生の抑制剤は抗ガン効果が期待できるとして最近多くの研究開発が進められている。

我々は HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) と human fibroblast の共培養系を用いて HUVEC の管腔形成を観察した。endogenous nucleosides と nucleotides, medicinal nucleoside やそのアナログを培地に添加してその効果を比較した。さらに、希少糖 D-allose と D-psicose を糖部にもつヌクレオシド 8 種を合成して同様の検討を試みたので報告する。

18. D-Psicose ameliorates glucose intolerance and hyperlipidemia in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats.

MA. Hossain¹, F. Yamaguchi¹, K. Kamitori¹, Y. Dong¹, Y. Hirata¹, S. Kitagaki¹, I. Tsukamoto³, D. Nakano², A. Nishiyama MD², S. Alam⁴, M. Tokuda¹

(¹Department of Cell Physiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan, ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan, ³Department of Pharmaco-Informatics, Faculty of Medicine, Kagawa University, Kagawa, Japan, ⁴Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Kagawa, Japan)

Hypoglycemic effect of D-psicose was investigated in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. D-psicose is a rare

sugar, a carbon-3 epimer of D-fructose and is produced from D-fructose through enzymatic isomerization using an immobilized D-tagatose 3-epimerase bioreactor. Recently rare sugars have attracted much attention due to their various uses, including low-calorie sweeteners and bulking agents. D-psicose has been shown to have zero energy for growth and may be a useful sweetener used as an aid for weight reduction. D-psicose supplements also suppress hepatic lipogenic enzyme activity and reduce intra-abdominal fat accumulation in normal rats.

In the present study, we evaluated the hypoglycemic effect of D-psicose in OLETF rats. Four-week-old male OLETF rats were divided into three groups: control OLETF group was fed water; psicose group was fed 5% D-psicose in water; D-glucose group was fed 5% D-glucose in water. A non-diabetic Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) counter group of OLETF was taken as control. Blood D-glucose (BG) concentration in the OLETF control rats was increased with time where the BG concentration in the OLETF rats given D-psicose was consistently lower throughout the experimental period and was significantly lower than the control rats as well as the OLETF rats fed on D-glucose from week 9 to week 14. Serum insulin was significantly lower in the OLETF rats given D-psicose than both the control groups and in those fed on D-glucose at the termination of the experimental period. D-psicose decreased the accumulation of peritoneal fat significantly than all other groups. These results suggest that D-psicose has a hypoglycemic property which could be provided an alternative to the presently dominant sweeteners in future due to its superiority of being zero-calorie sweetener and possessing multi-mechanisms for lowering blood sugar levels. D-psicose may be useful in the food industry as an aid to a large number of people suffering from obesity and diabetes.

19. 神経伝達物質放出に関わるシナプトタグミン 1 と SNARE 複合体の結合部位の同定

西木禎一¹, 増本年男¹, 大守伊織¹, 富澤一仁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熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学)

神経伝達物質は、シナプス小胞から Ca²⁺ 依存性に開口放出される。この開口放出には、小胞膜・シナプス前膜間で形成される SNARE 複合体が必須である。SNARE による膜融合は常時活性化されており、静止状態の神経終末にお

いて SNARE の働きを抑制している分子の存在が示唆されている。その候補であるシナプス小胞タンパク質シナプトタグミンと SNARE との結合を解析した。ラット脳可溶性物から免疫沈降を行うと、シナプトレビン、シntaxin、SNAP-25 からなる SNARE 複合体がシナプトタグミンと Ca^{2+} 非依存性に共沈した。組換えタンパクを用いた結合実験において、シナプトタグミンは三種類の SNARE のうちシntaxin とのみ結合した。シナプトタグミンの二つの C₂ ドメインに保存されているリジン (K) 残基の正電荷を中和するためにグルタミン (Q) に置換すると、C₂B KQ 変異ではシntaxin との結合が阻害されたが、C₂A KQ では影響がなかった。シナプトタグミンの結合部位を調べるために、シntaxin の SNARE 複合体形成ドメイン中の負電荷をもつグルタミン酸 (E) を Q に置換すると、E¹⁹⁴, ¹⁹⁶, ²¹¹Q 変異シntaxin でシナプトタグミンへの結合が減少した。以上の結果より、シナプトタグミンはシntaxin と Ca^{2+} 非存在下で結合することが明らかとなった。静止状態のシナプス前終末においてシナプトタグミンがシntaxin を介して SNARE の働きを制御している可能性が考えられる。

20. ラット視床下部における暑熱暴露による神経新生の加齢変化

松崎健太郎, 片倉賢紀, 原 俊子, 李 光華, 橋本道男, 紫藤 治 (鳥根大学医学部環境生理学)

【目的】これまでに、我々は暑熱暴露が若齢ラット視床下部で神経新生を促進することを見出した。本研究では、暑熱暴露された老齢ラット視床下部神経前駆細胞の分裂と分化を解析した。

【方法】Wistar 系雄性ラット (5 週齢, 若齢ラット: 24 ヶ月齢, 老齢ラット) 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 の暑熱環境に暴露した。暴露開始直後から Bromodeoxyuridine (BrdU: 50mg/kg/day) を腹腔内へ 5 日間連続投与した。暑熱暴露開始から 53 日目にラットをペントバルビタールで麻酔し, 脳を摘出した。脳組織の凍結切片を作成し, 抗 BrdU 抗体や抗 Neuronal nuclei (NeuN) 抗体 (成熟神経細胞マーカー) および抗 Glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (アストロサイトマーカー) を用いて免疫組織化学的に解析した。

【結果・考察】暑熱暴露により若齢ラット視床下部の BrdU 陽性細胞数は顕著に増加したが, 老齢ラット視床下部では変化しなかった。また, 若齢ラット視床下部の BrdU 陽性細胞のうち約 35% が抗 NeuN 抗体で染色されたが, 老齢ラットではほとんど検出されなかった。一方, 両群の視床下部 BrdU 陽性細胞は抗 GFAP 抗体ではほとんど染

色されなかった。これらの結果から、暑熱暴露は若齢ラット視床下部の神経新生を促進するが、老齢ラット視床下部にはほとんど影響しないことが示唆された。暑熱暴露による視床下部神経細胞新生の加齢による低下が、暑熱に対する高齢者の体温調節機能変化に関与する可能性が考えられる。

21. オキシトシンは雄マウスでの交尾行動ならびにシルデナフィルによる抗うつ効果に関与する

松下博昭¹, 富澤一仁², 沖本直輝¹, 西木禎一¹, 大守伊織¹, O. Bosch³, ID. Neumann³, 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熊本大学大学院医学薬学研究部分子生理学, ³Department of Behavioral Neuroendocrinology, University of Regensburg)

オキシトシンはうつ、不安、信頼などの中枢神経機能に関係していることがわかっている。最近の研究により、雄ラットで交尾行動によって分泌されたオキシトシンに抗不安作用があることが明らかになった。さらに勃起不全治療剤として用いられているシルデナフィル (バイアグラ[®]) には、オキシトシンを分泌させる作用があることが明らかになった。

本研究は、雄マウスの交尾行動ならびにシルデナフィル投与により分泌されたオキシトシンに抗うつ効果があるか明らかにすることを目的として実施した。うつ行動の評価には、強制水泳試験を用いた。強制水泳試験は、強制水泳により生じる無動を動物のうつ行動とし、その時間の短縮をもって抗うつ効果を測定する試験方法である。その結果、野生型マウスの交尾行動後では、無動時間に差が認められたがオキシトシン受容体欠損型マウスの交尾行動後では、差がなかった。さらに野生型とオキシトシン受容体欠損型マウスにシルデナフィルを投与後に強制水泳試験を行い無動時間に差が認められた。以上の結果から交尾行動ならびにシルデナフィルによる抗うつ効果がオキシトシンを介していることが示唆された。

22. 幼仔期ストレスが成熟後の不安行動と内側前頭前皮質および扁桃体ニューロン活動に及ぼす影響

西村亮一, 石川晃教, 石川淳子, 中村彰治 (山口大学大学院医学系研究科高次神経科学講座システム神経科学)

幼児期のストレスは、成熟後の外傷後ストレス障害やパニック障害といった精神疾患を引き起こす一因と考えられている。これらの疾患では強い不安や恐怖反応がみられるため、情動の制御機構に異常があると考えられる。情動の制御に関わる主な神経機構は内側前頭前皮質による扁桃体への抑制性の制御である。扁桃体への内側前頭前皮質

ニューロンの投射の軸索終末は思春期頃まで発達し続け、この経路の障害は強い不安および恐怖の発現や、恐怖記憶の消去過程の障害に関与していると考えられている。本研究では、内側前頭前皮質—扁桃体の神経回路の発達にあわせた時期のストレスが、成熟後の不安行動や内側前頭前皮質と扁桃体の神経活動に与える影響を調べた。幼仔期に慢性ストレスを与えたラットでは、成熟後のオープンフィールドテストと高架式十字迷路において不安行動の増加がみられた。また、オープンフィールドテスト後の内側前頭前皮質と扁桃体の Fos の発現パターンに変化がみられた。ストレスを与えていない群と比較して、幼仔期ストレスを与えたラットでは、右腹側内側前頭前皮質浅層の神経活動の減少および右扁桃体基底外側核の神経活動の増加傾向がみられた。これらの結果から、内側前頭前皮質から扁桃体への投射が発達する時期のストレスは、成熟後の不安行動と内側前頭前皮質と扁桃体の興奮性に影響を与えることが示唆される。

23. 早期離乳による不安様行動発現とセロトニン神経線維密度低下に対する運動の改善効果

出来谷祐子, 石川淳子, 石川晃教, 中村彰治 (山口大学医学部高次神経科学講座システム神経科学)

現代では、情動を適切に制御できない子供や若者の増加

が、深刻な社会問題となっている。この原因として、情動制御に関わる前頭前野の発達障害が考えられる。前頭前野の発達には、セロトニンが調節的な役割を担っていることを示唆する報告がある。一方、運動は「脳の発達に良い」といわれているが、それを直接的・科学的に証明した報告はない。ラットを用いた研究では、発達期ストレスである早期離乳で、情動行動に異常が起きることが報告されている。そこで、本研究では、早期離乳による行動変化とそれに対する運動効果を検討した。さらに、早期離乳と運動がセロトニン神経系に及ぼす影響を調べるため、抗セロトニントランスporter抗体を用いた免疫染色で、前頭前野におけるセロトニン神経線維密度の変化を検討した。

行動実験では、オープンフィールドテストにおける早期離乳群の不安様行動の増加傾向が確認された。また、早期離乳群では対照群と比べて、前頭前野におけるセロトニン神経線維密度が有意に減少していた。一方、早期離乳後に自発運動をさせた群では、不安様行動の増加とセロトニン神経線維密度の減少は認められなかった。以上の結果より、早期離乳ストレスによる不安様行動の増加傾向は、運動により改善されることが確認された。さらに、前頭前野のセロトニン神経線維の密度低下が、早期離乳による不安様行動の発現に関係している可能性が示唆された。