

## 第 57 回中部日本生理学会

会 期：2010 年 10 月 15 日（金）、16 日（土）

会 場：藤田保健衛生大学医学部

当番幹事：宮地栄一、太田 明

参加者：95 名

演題数：47 題（口演 29 題、ポスター 18 題）

第 57 回中部日本生理学会は、演題募集で口演希望が 29 題、ポスター発表希望が 18 題あり、それぞれ希望通りの構成で開催しました。口演、ポスター共に多くの大学、研究所の研究者による様々な分野の発表があり、活発な質疑応答がありました。その他に藤田保健衛生大学総合医科学研究システム医科学の宮川剛教授により特別講演「精神疾患の中間表現型としての未成熟歯状回」が行われました。行動異常に関連する遺伝子の解析について難しい内容をわかりやすく講演していただき、こちらの質疑応答も大変活発でした。総会では生理学会各種委員会報告、次回当番幹事の紹介、次々回当番幹事の決定、新任教授の紹介がありました。第 1 日目の夜に開かれた懇親会には 53 名の参加者があり、会員相互の親睦を深めました。また、第 2 日目には大会終了後に 14 名の参加者によるテニス大会が開催され、有志の親睦をさらに深めたように思います。

### O-1. セロトニンによる消化管ペースメーカー細胞活性化のメカニズム

中山晋介, 谷口瑞毅, 武川紅年 (名古屋大学大学院医学系研究科)

「腹蔵なく話す」「腹をさぐる」「腹をくくる」「腸（はらわた）が煮えくり返る」、「断腸の思い」などなど、日本語には、まるで腹のなかに精神や意思の深層が宿るかのよう数多くの表現がある。私たちが、このような表現を使用してコミュニケーションできる背景には、それを実感する何らかの身体メカニズムを共有するためと考えられる。

消化管は末梢自律神経系に属するが神経叢が内在する。この神経の働きにより蠕動などの重要な消化管運動が発生することがよく知られている。さらに最近では、輪走筋と縦層筋層間にある神経叢（筋層間神経叢）において、受容体型チロシンキナーゼ c-Kit を多量に発現する特殊な間質細胞が、ペースメーカー細胞として働くことが分かってきた。この間質細胞のネットワーク状に連なる形態が、組織学者 Cajal の描いたスケッチとよく似ていることから、Cajal の間質細胞（Interstitial cells of Cajal）と呼称される。

私たちは、ICC のペースメーカー活動が 5-HT によって活性化されることを見いだした。このペースメーカー活動は、粘膜を取り除いた標本でも観察されるが、5-HT を枯渇する処置により大きく抑制される。この事実、筋層間神経叢から放出される内因性 5-HT が基礎的なペースメーカー活動

の発生に深く関与することを示している。また、RT-PCR、免疫化学染色、薬剤効果等の結果は、この 5-HT の作用は 5-HT<sub>3</sub> 受容体を介した反応であることを強く示唆した。この消化管ペースメーカー細胞活性化メカニズムは、精神面と相関が知られる過敏性腸症候群などの疾患において、重要な役割を果たす可能性が考えられる。今回の発表では、特に、ICC ネットワークの電位伝搬特性に関する 5-HT の効果について報告する。

### O-2. 超高感度磁気センサによる細胞組織測定

熱田論志<sup>1,3</sup>, 内山 剛<sup>2</sup>, 中山晋介<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大学医学系研究科, <sup>2</sup>名古屋大学工学系研究科, <sup>3</sup>フジデノロ株式会社)

磁気インピーダンス (MI) 技術を応用し、生体磁気が観測可能な超高感度磁気センサの開発を、現在、行っている。今回、1nT~100pT の検出感度を持つパルス励起タイプ MI センサを作製することにより、モルモットの標準的な細胞組織からの磁気信号を計測することができた。得られた磁気波形データは、電位測定データに追従しており、細胞組織の電気活動に起因した磁気波形であることが分かる。さらに、テトラエチルアンモニウム (TEA) などのイオンチャネルへ影響を及ぼす薬剤を投与すれば、磁気波形の変化を観測することができた。このような超高感度磁気センサを進展させることにより、様々な培養組織に対して完全非侵襲にその機能性を評価するツールを創出できると考えられ

る。今回の実験成果は、磁気センサ技術のバイオや医学領域への広い応用の可能性を示すものである。

### O-3. 生体電気インピーダンス (BI) 法による腹式・胸式呼吸法判別の検討

西村るみ子<sup>1</sup>、増尾善久<sup>2</sup>、桑原裕子<sup>1</sup>、清水祐樹<sup>1</sup>、岩瀬敏<sup>1</sup>、菅屋潤壹<sup>1</sup> (愛知医科大学医学部生理学第2講座、<sup>2</sup>早稲田大学スポーツ科学研究センター)

呼吸活動は、腹式呼吸と胸式呼吸に大きく分類される。理学療法の分野では、換気能力改善の一環として腹式呼吸法の指導がなされていることから、簡便な呼吸法判別技術を確立することは、呼吸機能訓練時や、自律神経と呼吸機能の関連を研究する際に有用となる。

本研究では、腹式呼吸と胸式呼吸に寄与する呼吸筋群の違いに着目し、生体電気インピーダンス法 (BI) を用いて腹部呼吸筋と胸部呼吸筋の活動を分離計測し、簡便性の高い呼吸法判別技術として有用であるか否かを検討した。

健康な男性および女性を被験者とした。立位にて普通呼吸、胸式呼吸および腹式呼吸を行わせ、Respiratory Inductive Plethysmograph (RIP) による胸部 (Rib) と腹部 (Ab) の周径変化を測定し、その比 ( $\Delta Rib/\Delta Ab$ ) を胸式/腹式呼吸法判別基準として採用した。その際、スパイロメトリー法による換気量の測定を同時に行い、Rib と Ab の動きを確認し、呼吸に同期した動きをしない被験者には、RIP 法から得られる Konno-Mead diagram (Lissajous) を被験者に見せながら、徹底した呼吸法の指導を行った。BI 法データは、拘束性の少ない四肢誘導法を用いて、体幹上部と中部の生体電気インピーダンス比 ( $\Delta Z_{trc}/\Delta Z_{tru}$ ) を得た。

その結果、RIP 法による  $\Delta Rib/\Delta Ab$  と BI 法による  $\Delta Z_{trc}/\Delta Z_{tru}$  に有用な関係が認められ、BI 法が呼吸法判別技術として有用である可能性が示唆された。

### O-4. 異なる怒責の加え方に対する直腸内圧と循環系への影響

今井美香<sup>1</sup>、岩瀬敏<sup>2</sup>、桑原裕子<sup>2</sup>、西村直記<sup>2</sup>、清水祐樹<sup>2</sup>、平井真理<sup>1</sup>、菅屋潤壹<sup>2</sup> (名古屋大学大学院医学系研究科、<sup>2</sup>愛知医科大学生理学第2講座)

目的：本研究では排便時を想定した座位姿勢で、横隔膜を挙上させる怒責と腹圧を上昇させる怒責のかけ方による胸腔内圧と直腸内圧の関係と腹筋活動の反応を明らかにし、さらに血圧と心拍数への影響に差異はあるか検討した。

方法：被験者は健康者12名(男性5名、女性7名、27.2±5.3歳)とし、便座に着座して10分以上の安静をとった後、胸腔内圧が10、20、30mmHg、直腸内圧が10、20mmHgになるように怒責をそれぞれ15秒間ずつ負荷し、負荷後2

分間の安静をとった。実験の開始から終了まで、胸腔内圧、直腸内圧、腹直筋下部の表面筋電図、血圧、心拍数をサンプリング周波数1kHzで記録した。

結果：胸腔内圧10、20、30mmHgに対する直腸内圧は、それぞれ8.8±0.6、17.1±1.9、25.5±3.4mmHg(平均値±SD)であった。直腸内圧10、20mmHgに対する胸腔内圧は、10.3±0.5、12.3±1.1mmHgであった。腹直筋下部の筋活動は、胸腔内圧を基準にした怒責時に比して直腸内圧を基準にした怒責時で増大し、血圧および心拍数の変化量は減少した。

考察：直腸内圧を基準に腹圧を上昇させて怒責を加えることは横隔膜を挙上させる怒責に比し、下腹部に圧が集中するため腹直筋下部の筋活動が高まり、効率よく直腸内圧を高め排便できると推察された。同時に血圧と心拍数に対する影響が少なく、安全に排便できる可能性が示唆された。

### O-5. 人工重力負荷時における体温調節機能

高田真澄<sup>1</sup>、岩瀬敏<sup>1</sup>、西村直記<sup>1</sup>、清水祐樹<sup>1</sup>、桑原裕子<sup>1</sup>、西村るみ子<sup>1</sup>、今井美香<sup>2</sup>、菅屋潤壹<sup>1</sup> (愛知医科大学医学部生理学第2講座、<sup>2</sup>名古屋大学大学院医学系研究科健康発達看護分野)

微小重力状態における体温調節に関して、いまだ詳細な生理的機序は明らかになっていない。これまで、我々が用いてきた遠心力を応用した短腕式重力発生装置は、宇宙における無重量状態に対する不具合を総称する「宇宙飛行デコンディショニング」に対する対抗措置として注目を浴びている。この短腕式重力発生装置は、通常の1Gとは異なり印加重力が頭部では低く足部では高くなる。よって、遠心力によって発生する重力が  $g = r\omega^2$  ( $r$ :半径,  $\omega$ :角速度) で与えられるため、心臓の位置(中心から70cm)における印加重力が1Gであると、頭部(中心から30cm)では、0.4G、足部では2.7Gになる。このような重力勾配のもとでは、血流配分が頭部と足部では不均等となり、熱流速の不均等が生ずる可能性が考えられる。

人工重力発生装置のもとでの血流不均等および熱流速不均等を測定し、人工重力負荷時の体温調節機能について検討した。

健康な男女を対象とし、人工重力発生装置に乗せ、0.3G、0.6G、1.0G、1.4G、1.8Gの各10分ずつの人工重力を負荷した。各負荷の間には5分の休憩を取った。同時熱流速測定装置の電極を前額部、前胸部、下腿部に貼付し、皮膚表面からの熱流速を測定した。同時にバイオインプीडダンス法による体液移動を測定するために、前腕と下腿にバイオインプीडダンス測定用の電極を貼付し測定を行った。人工重力を負荷した際の熱流速、体液移動の変化についての実

験結果を併せて報告する。

#### O-6. 圧受容器破壊ラットの飲水による昇圧応答のメカニズム解明

安部 力, 岩田ちひろ, 森田啓之 (岐阜大学大学院医学系研究科生理学分野)

臥位から立位への姿勢変化時には、静水圧較差が増加し、血液の下方シフトが生じ、静脈還流量および心拍出量が減少し、その結果動脈血圧が低下する。この動脈血圧の低下は圧受容器反射により緩衝され、姿勢変化時の動脈血圧は維持されていると考えられている。実際、圧受容器が正常なラットでは起立時でも動脈血圧が維持されているのに対し、圧受容器を破壊したラット (SAD) では  $15 \pm 1$  mmHg 程度低下する。しかし、この応答は飲水時以外の起立時の応答であり、飲水を伴う起立の場合は昇圧応答が見られた ( $58 \pm 5$  mmHg)。そこで、今回我々は、SAD ラットを用いて、飲水時における昇圧応答のメカニズムを調べることとした。水ボトルの位置 (高所と低所)、飲水方法 (自発的と受動的)、水ボトルの中身 (水、5% グルコース溶液、生理食塩水) による昇圧応答の違いは見られなかった。また、口腔内へのリドカイン塗布や舌咽神経および上喉頭神経を切除した場合でも昇圧応答に違いは見られなかった。さらに、ラットの飲水速度と同速度 (1.3 ml/min) で胃内に直接水を投与した場合は昇圧応答は見られなかった。一方、起立飲水時の昇圧応答はプラズシン投与によって完全に消失した。これらの結果から、1) 飲水時における昇圧応答の遠心路は交感神経の  $\alpha 1$  受容体を介したものであること、2) 求心路の受容器は咽頭から食道までに存在し、舌咽神経および上喉頭神経以外の神経を介している可能性があることがわかった。

#### O-7. 月経周期にともなう汗腺の反応性の変動

鬼塚知里<sup>1</sup>, 松本孝朗<sup>2</sup>, 佐藤麻紀<sup>1</sup>, 清水祐樹<sup>1</sup>, 西村直記<sup>1</sup>, 犬飼洋子<sup>1</sup>, 岩瀬 敏<sup>1</sup>, 菅屋潤壹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>愛知医科大学医学部生理学第2講座, <sup>2</sup>中京大学体育学部健康科学科)

[はじめに]

月経周期は卵胞期と黄体期に分かれ、卵胞期には卵巣からエストロゲンが、黄体期にはエストロゲンとプロゲステロンが分泌される。体温は卵胞期の低温相と黄体相の高温相の2相性となる。高温相には、プロゲステロンが体温調節中枢に作用してセットポイントを高めるため、発汗量は低下するとされている。このような中枢を介した作用に対して、性周期が汗腺の感受性へ与える作用については明らかでない。

[目的]

本研究では、汗腺の感受性を定量的軸索反射性発汗試験 (以下 QSART) と汗腺密度を測定し、性差にて検討する。さらに女性については、卵胞期・排卵期・黄体期の3つのステージで測定を行い、月経周期ステージ間の比較を行う。

[方法]

実験は、室温 25°C、相対湿度 40% に制御した愛知医科大学人工気候室内で実施した。参加同意を得られた健康な 19 歳から 26 歳までの男性 13 名と女性 14 名を被験者とした。

被験者は、入室 30 分の安静後、QSART カプセルを前腕屈側上腕・下腿伸側面の皮膚に装着した。10% アセチルコリン溶液を含むスポンジを入れた最外槽と電極パッド (前腕・下腿) との間に 2.0 mV の直流電流を 5 分間流しイオントフォレーシスを行った。通電終了後、別途用意した同型のカプセルと交換し、10 分間の直接刺激による発汗 (以下 DIR) を記録した。QSART 終了後、ヨウ素澱粉法を行い活動汗腺の密度を決定した。これらの実験を男性被験者は 1 回、女性被験者は 3 つのステージで測定を行った。

[結果および結論]

DIR は、男性より女性に有意に少なかった。性周期との関係では、前腕 屈側・下腿伸側面の DIR は、卵胞期・排卵期・黄体期の間で有意な差はみられなかった。以上のことから汗腺の反応性に性差があることは明らかとなったが、月経周期による影響は少ないことが示唆された。

#### O-8. 片側顔面紅潮と交叉性発汗障害を呈した 3 小児例とその経過の機序

犬飼洋子<sup>1</sup>, 岩瀬 敏<sup>1</sup>, 西村直記<sup>1</sup>, 佐藤麻紀<sup>1</sup>, 清水祐樹<sup>1</sup>, 桑原裕子<sup>1</sup>, 菅屋潤壹<sup>1</sup>, 泉 雅之<sup>2</sup>, 佐橋 功<sup>2</sup>, 宮崎良樹<sup>3</sup>, 中村有里<sup>3</sup>, 堀 壽成<sup>3</sup>, 鶴澤正仁<sup>3</sup>, 玉田康彦<sup>4</sup> (<sup>1</sup>愛知医科大学医学部生理学第2講座, <sup>2</sup>愛知医科大学神経内科, <sup>3</sup>愛知医科大学小児科, <sup>4</sup>愛知医科大学皮膚科)

本研究は暑熱下の交叉性発汗障害と片側顔面紅潮すなわち harlequin syndrome を呈した 3 小児例での発症機序と、そのうち経過観察した 2 例における障害の経過の機序についての検討である。症例 1 は 1 歳 9 か月男児で、入浴時での顔面右半側の紅潮、対側の顔面から C4 領域までの分節状無汗、顔面紅潮側のその同レベル領域と顔面無汗側の C5 以下の発汗亢進があり、ミノール法による温熱発汗試験で確認した。症例 2 (2 歳 1 か月男児)、症例 3 (9 歳男児) も症例 1 と同様の症候 (無汗部は C5 領域まで、症例 3 のみ反対側) を認めた。Adie 瞳孔、腱反射消失はない。症例 3 は右 Horner 症候群を随伴した。症例 2, 3 の皮膚血流量は無汗部で低下し、それ以下の領域では左右差はなかった。発汗亢進部の存在は、無汗部に対する代償性と思われた。症例 1 は上頸-中頸神経節間、症例 2, 3 は中頸-椎骨動脈神

経節間の交感神経節前線維の損傷が疑われた。無汗部は症例1で3歳3か月時同側のT2領域まで、症例3で11歳時にC8領域まで及んでいた。よって損傷部位より変性が交感神経幹内を下方へ進展した可能性がある。この機序について考察する。

#### O-9. 培養系を用いた ramified 型ミクログリア活動性の解析

増田 匡, 飛田秀樹 (名古屋市立大学医学研究科脳神経生理学講座)

脳内免疫担当細胞のミクログリアは、多数の突起を持った ramified 型と円形の amoeboid 型がある。正常脳内にある Ramified 型は、突起を活発に伸長・退縮させて周辺の微小環境をモニターし、病的環境下で突起を失い deramification し、Amoeboid 型へと変化すると考えられている。しかし、我々はこれまでに完全な無血流状態においてミクログリアの突起活動性が完全に消失し、deramification すら生じないことを *in vivo* で確認している。本研究は、ミクログリアの活動性制御機構をより明らかにすることを目的に、形態変化と突起の活動性を *in vitro* で評価できる新たな実験系の導入を試みた。その結果、ミクログリアを Matrigel 内で24日間培養することにより ramified 型ミクログリアを得ることに成功した。また生理的条件下で ramified 型ミクログリアが盛んに突起を伸長・退縮させていることを確認した。さらに、無酸素・無グルコース条件下でも、突起の活動性は残存し deramification が生じることを確認した。このことから、無血流状態でミクログリアの突起活動性や形態変化が消失する *in vivo* でのメカニズムは、*in vitro* 系で完全に再現することは困難であり、*in vivo* において複数の細胞種が関与する複雑なものであることが示唆された。

#### O-10. 内包出血後の麻痺肢強制使用は使用に応じた脳領域の可塑的变化を惹起する

石田章真<sup>1,2</sup>, 濱川みちる<sup>1</sup>, 玉越敬吾<sup>1</sup>, 飛田秀樹<sup>2</sup>, 石田和人<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻, <sup>2</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科脳神経生理学講座)

近年、脳損傷後における麻痺肢の集中的使用(CI療法)がその有効性から注目を集めている。しかし、麻痺肢使用が中枢神経系に及ぼす影響については不明な点が多い。本研究では内包出血後の麻痺肢強制使用が中枢神経系に及ぼす影響を解析した。

実験動物には Wistar 系雄性ラットを用い、実験群として (1) 出血-強制使用群, (2) 出血-対照群, (3) 健常-強制使用

群, (4) 健常-対照群を設定した。出血群のラットには利き手と対側の内包に collagenase (15units/ml, 1.4μl) を注入した。術後24時間より強制使用群ラットの非麻痺側前肢をギプス包帯にて7日間拘束し麻痺肢のみを使用させた。

その結果、前肢巧緻運動機能(リーチ機能, ステップ機能)に関し出血-強制使用群で有意な改善を認めた。皮質脊髄路の傷害程度に関しては群間で差を認めなかった。また、神経活動マーカー蛋白である ΔFosB の発現を解析したところ、出血-強制使用群の麻痺肢支配側の感覚運動野において ΔFosB 陽性細胞数の有意な増加を認めた。加えて、両側感覚運動野における成長関連因子(BDNF, GAP43)の mRNA 発現量を解析したところ、同様に出血-強制使用群の麻痺肢支配側の感覚運動野において有意な発現増加を認めた。

以上の結果より、麻痺肢強制使用は使用に応じた領域での神経賦活化および成長関連因子発現増加を惹起していることが示唆された。

#### O-11. 脳梗塞モデルラット作成前の運動が脳梗塞に及ぼす影響～抗酸化作用に着目して～

濱川みちる<sup>1</sup>, 嶋田 悠<sup>1</sup>, 中島宏樹<sup>1</sup>, 石田章真<sup>1</sup>, 玉越敬吾<sup>1</sup>, 豊國伸哉<sup>2</sup>, 石田和人<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋大学医学系研究科リハビリテーション療法学専攻, <sup>2</sup>名古屋大学医学系研究科病理病態学講座生体反応病理学/分子病理診断学)

【目的】脳梗塞発症前に運動を実施することの効果および作用機序を抗酸化作用に着目して検討する。

【方法】ラットを無作為に運動群と非運動群に分け、運動群はトレッドミル運動(15m/min, 30分/日)を3週間毎日行った。その翌日、各群に中大脳動脈閉塞再開通モデル作成手術を施行し、24時間後、運動・感覚機能評価4項目(Neurological Deficits: ND, Beam Walking: BW, Ladder test, Limb Placing: LP)を行った。その直後に脳を採取し、TTC染色により梗塞体積を測定した。また同切片を用いて、酸化ストレス産物の指標として4-hydroxy-2-nonenal [4-HNE] 及び8-Hydroxydeoxyguanosine [8-OHdG] の免疫染色を行った。

【結果】NDとladder testにおいて、運動群は有意に障害が軽減した(p<0.05)。また、他の機能評価や梗塞体積については群間に有意差は認められなかった。免疫染色では、非運動群の非梗塞側半球で4-HNE陽性細胞が多い傾向にあったが、8-OHdG染色では差を認めなかった。

【考察】脳梗塞前の運動は、梗塞後の運動機能改善効果をもたらしたものの、梗塞体積は非運動群と同程度であった。しかし、脂質過酸化の指標である4-HNE陽性細胞は非運動群の非梗塞側でより多く見られ、運動が酸化ストレスを抑

制することにより運動機能の改善を導く可能性が考えられた。

#### O-12. 異なるストレス後のゼブラフィッシュ網膜における HSP70 の発現比較

藤川千恵子<sup>1</sup>, 永島幹子<sup>1,2</sup>, 馬渡一浩<sup>1</sup>, 加藤 聖<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大学大学院医学系研究科保健学, <sup>2</sup>金沢大学大学院医学系研究科脳情報分子学)

ストレス応答分子 Heat shock proteins (HSPs) は様々な環境ストレスからの細胞保護に重要な役割を果たしている。哺乳類と異なり、魚類中枢神経は損傷を受けても再生が可能である。本研究では、熱ストレス (37°C, 30分) あるいは視神経損傷という二つの異なるストレスを与えた後のゼブラフィッシュ網膜における HSP70 の発現について比較を行った。熱ストレス後、HSP 70mRNA は全網膜顆粒層において 0.5-3 時間で発現が増加した。HSP 70mRNA は、核内移行した活性型 Heat shock factor 1 (pHSF1) によって転写調節される。熱ストレス後 pHSF1 は全網膜顆粒層で発現が増加していたが、HSF 1mRNA の増加は見られなかった。一方、視神経損傷後ゼブラフィッシュ網膜では、網膜神経節細胞において損傷後 0.5-72 時間で HSP 70 mRNA の増加が見られた。また、この増加は HSF 1mRNA と pHSF1 の増加を伴っていた。

以上のことから、熱ストレス後の一時的 (0.5-3 時間) な HSP 70mRNA の増加は pHSF1 核内移行量増加によるものであり、視神経損傷後の持続的 (0.5-72 時間) な増加は HSF 1mRNA の増加と pHSF1 核内移行量増加によるものであるということが示唆された。

#### O-13. 視神経損傷後の魚類網膜における幹細胞関連転写因子の発現上昇

西谷真希<sup>1</sup>, 永島幹子<sup>1,2</sup>, 馬渡一浩<sup>1</sup>, 加藤 聖<sup>2</sup> (<sup>1</sup>金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻, <sup>2</sup>金沢大学大学院医学系研究科脳情報分子学)

魚類の視神経は損傷を受けても軸索の再伸長が可能であることが知られている。この軸索再生過程には軸索再伸長因子の発現が不可欠である。さらにこの因子は転写調節を受けている。iPS 細胞とは体細胞に数種類の転写因子を導入し、幹細胞化させた分化万能性を持つ細胞のことである。そこで iPS 細胞誘導遺伝子である KLF4, SOX2, c-myc, OCT3/4 の 4 つの転写因子に注目し、視神経再生過程に関与しているかを検討した。

正常なゼブラフィッシュ網膜において KLF4, SOX2, c-myc mRNA は発現していたが OCT3/4 の発現は見られなかった。また OCT3/4 以外の 3 因子は損傷後 3-10 日

mRNA 発現量が増加した。

次に mRNA の局在を調べたところ、KLF4 mRNA は網膜神経節細胞層 (GCL) と内顆粒層 (INL) に陽性細胞が見られた。SOX2 mRNA は GCL にのみ陽性細胞が見られた。

SOX2 のタンパク質量は損傷後 40 日まで増加傾向を示しており、この増加は GCL で、損傷後に起こっていた。

以上の結果より、視神経損傷後 3-10 日にこれらの転写因子の発現量が増加したことから、損傷を受けた細胞が幹細胞化している可能性が示唆された。また、この時期は軸索再伸長期にあたるため、軸索再伸長に関する遺伝子発現を誘導していることが推測された。

#### O-14. 外側扁桃神経細胞における 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介した脱分極

山本 亮, 須貝外喜夫, 加藤伸郎 (金沢医科大学生理学 I)

扁桃体に投射するセロトニン (5-HT) 作動性線維の、行動行動における大きな役割は既知である。今回我々は、ラットの脳スライスを用いて、扁桃体外側核神経細胞からパッチクランプ記録を行い、5-HT が扁桃体外側核神経細胞の興奮性をどのように調節しているかを調べた。外液に 5 $\mu$ M の 5-HT を加えると、外側扁桃神経細胞の静止膜電位は約 5mV 脱分極した。この脱分極の電気的特性を調べるためボルテージクランプにて、-50mV から -130mV へのランプステップに対する電流応答を調べた。その結果、得られた逆転電位は約 -110mV であった。5-HT<sub>2</sub> 受容体のアゴニスト  $\alpha$ -m-5-HT、5-HT<sub>2C</sub> 受容体アゴニストの Way161503 でも同様の逆転電位が得られた。この逆転電位は本実験条件での K<sup>+</sup> の逆転電位より深く、K<sup>+</sup> 電流の減少と何らかの内向き電流の増加が示唆される。そこで、Ba<sup>2+</sup> 400 $\mu$ M を外液に加えた条件で、5-HT による脱分極電流を調べたところ、内向き電流のみが観察され -50mV から -130mV の間では逆転電位は現れなかった。さらに非選択的陽イオンチャネルの阻害剤 Fulfenamic acid を外液に加えると、残っていた内向き電流も消失した。これらの結果から、セロトニンは 5-HT<sub>2C</sub> 受容体を介し、Ba<sup>2+</sup> 感受性の K<sup>+</sup> チャネルを抑制し、非選択的陽イオンチャネルを活性化することで、外側扁桃神経の静止膜電位を脱分極方向へシフトさせると考えられる。

#### O-15. 大脳皮質錐体細胞の興奮性とうつ様行動との関連性

孫 鵬, 王 麗, 張 昱, 王 芙蓉, 山本 亮, 王 正大, 須貝外喜夫, 加藤伸郎 (金沢医科大学生理学 I)

うつ病成因仮説のモノアミン仮説は、モノアミンオキシターゼ阻害薬やセロトニン選択的再取り込み阻害薬の薬効に基づいて提唱され、他方、これらの阻害薬が即効性ではなく数週間の潜伏期をともなって奏功することに基づいて疑問視もされている。これへの代替仮説として、うつ病患者の海馬が委縮していること、また神経新生の多寡がモデル動物のうつ様症状の出現・消退と関連していることなどにに基づき、神経可塑性仮説が提唱されている。これらに加えて、近年の臨床的研究ではうつ病患者における大脳皮質興奮性の増大と治療によるその減少が明らかになってきており、これらに基づくニューロン過興奮仮説が浸透しつつある。

この研究では、この臨床報告に立脚した過興奮仮説が動物モデルにも妥当するかどうかをテストした。マウスうつ病モデルの一つである強制水泳パラダイムを用いて、うつ様行動の発現および、そのモデル治療による消退が、大脳皮質興奮性と関連しているかどうかを調べた。

34カ月齢のC56BL/6マウスに5日連続で強制水泳を行わせた。2日目以降、総移動距離と不動時間の2つの指標によりうつ様行動の導入が確認された。その後、水泳させることなく反復経頭蓋磁気刺激(rTMS)を4週間にわたって連日施行するTMS群に対し、noTMS群では無処置で飼育を続けた。その後、noTMS群へオープンフィールドテストを課して、野生群との比較によりうつ様行動の4週間に及ぶ持続が確認された。続けて強制水泳も行い、総移動距離と不動時間の2つの指標によりうつ様行動も4週間持続していたことを確認した。一方、TMS群ではnoTMS群に比べ、これら2つのテストによるうつ様行動が有意に改善していた。両群のマウスの帯状回から脳スライスを作製し、錐体細胞からのホールセル記録により静止膜電位・定電流の注入による誘発活動電位の頻度・誘発活動電位の幅などの指標を評価した。noTMS群において野生群より有意な興奮性増大が認められ、興奮性はTMSで低下した。これらの結果は、ニューロン興奮性とうつ様行動の相関性を示唆しており、うつ病成因のニューロン過興奮仮説を支持する。

#### O-16. Single-unit activity in the monkey medial prefrontal cortex during action observation and execution

MFP Araujo<sup>1</sup>, E Hori<sup>1</sup>, C Tomaz<sup>3</sup>, T Ono<sup>2</sup>, H Nishijo<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>System Emotional Science, <sup>2</sup>Department of Judo Neurophysiotherapy, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan, <sup>3</sup>Laboratory of Neuroscience and Behavior, University of Brasilia, Brazil)

The medial prefrontal cortex (mPFC) is implicated in goal-based action selection, action planning and error rec-

ognition. Previous brain imaging studies also related this region as a part of a brain network related to social cognition processes. These previous data suggest that this area may play a central role in social-based decision making. However, it remains unclear how, at neuronal level, this area contributes to social cognition. In the present study we trained two *Macaca fuscata* monkeys (observers) to observe a robot arm (demonstrator) choosing one of two figures displayed on a touch screen. At each trial, one of the figures was randomly assigned as correct. If the demonstrator chose the wrong figure, the trial restarted. Every time the demonstrator chose a correct option, the same pair appeared on a touch screen attached to the observer's chair. Then, the observer, based on the demonstrator's performance, had to choose the correct figure to obtain a reward. Feedback signals were presented to the observers after choice. During this task, we recorded the neural activity from the upper and lower banks of the anterior cingulate sulcus of the observers. Statistical significance of the neuronal responses was assessed by 1-way ANOVA among the 5 periods in the task: baseline (before the beginning of the trials), action observation (robot arm choices), action preparation (interval between observation and action), action (monkeys choices) and feedback (after the end of the feedback signals). Of 129 neurons analyzed, 28 (21.7%) responded during one or more phases of the task. Furthermore, in 18 (13.9%), neuronal activity during action observation was significantly correlated with that during real action (execution). These data indicate that the mPFC processes information about self and others actions, which may support social-based decision making.

#### O-17. Conditional depletion of PDGF- $\beta$ receptor gene in the central nervous system induced deficits in higher brain functions in mice

Nguyen Tin Hong Phuong<sup>1</sup>, E Hori<sup>1</sup>, Z Juanjuan<sup>1</sup>, R Li<sup>1</sup>, S Urakawa<sup>2</sup>, T Uwano<sup>4</sup>, T Hamashima<sup>3</sup>, Y Ishii<sup>3</sup>, T Matsushima<sup>3</sup>, M Sasahara<sup>3</sup>, T Ono<sup>2</sup>, H Nishijo<sup>1</sup> (<sup>1</sup>System Emotional Science, <sup>2</sup>Department of Judo Neurophysiotherapy, <sup>3</sup>Department of Pathology, <sup>4</sup>Integrative Neuroscience, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan)

Platelet-derived growth factor (PDGF) is one of the major mitogens for fibroblasts, smooth muscle cells and other cells. The important functions of PDGF during embryo-

genesis, in particular for development of the kidneys, blood vessels, lungs and CNS have been extensively reported in previous *in vivo* studies of PDGF and PDGF receptor gene targeting in mice. However, there have been no studies on behavioral effects of PDGF gene deletion in mice. In the present study, novel mutant mice (PDGFR- $\beta$  KO) were developed, in which the gene encoding the  $\beta$  subunit of PDGF receptor (PDGFR- $\beta$ ) was conditionally deleted in the CNS neurons using Cre/loxP system. The mice without Cre transgene but with floxed PDGFR- $\beta$  were used as controls. Both of these mice reached adulthood without apparent anatomical defects. These mice were further tested with several behavioral tests including spatial memory test (SMT), social interaction (SI), conditioning test (CT), prepulse inhibition (PPI), and forced swimming test (FST). The behavioral results indicated that the PDGFR- $\beta$  KO mice displayed deficits in all of the behavioral tests. Furthermore, immunohistochemical analyses of the brain indicated that number of parvalbumine-positive neurons was decreased in the amygdala and the prefrontal cortex including the anterior cingulate cortex in the PDGFR- $\beta$  KO mice. These results suggest that PDGFR- $\beta$  plays an important role in various higher brain functions including emotion, memory, and social behaviors.

#### O-18. 細胞移動性に対するクローディン-2発現の影響

五十里 彰, 滝口亜佑美, 跡見康輔, 佐藤友成, 菅谷純子 (静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学)

糸球体で濾過された電解質イオンは, 尿管から再吸収され, 体内のホメオスタシスが維持される。しかし, 薬剤や炎症反応などにより尿管が障害を受けると, ホメオスタシスの維持が困難になる。そのため, 障害を受けた尿管には修復機構が働くと考えられるが, その詳細なメカニズムは不明である。近年, 高浸透圧ストレス障害により, タイトジャンクションを形成するクローディン-2の発現が低下することが報告された。本研究では, 細胞増殖と移動性に対するクローディン-2発現の影響を検討した。

MDCK細胞において, 高浸透圧処理により, クローディン-2の発現が低下した。次に, クローディン-2ノックダウン細胞を作成して細胞増殖を調べたが, 変化はみられなかった。一方, ノックダウン細胞で, 創傷治癒率が増加したことから, クローディン-2発現の低下が移動性の増加を引き起こすと示唆された。また, ノックダウン細胞では, マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9の発現量と活性が増加した。さらに, 高浸透圧処理によりクローディン-

2発現が低下した細胞ではMMP-9発現が増加し, クローディン-2を強制発現した細胞ではMMP-9発現が低下した。以上のことから, 細胞障害によってクローディン-2発現が低下し, MMP-9活性の増加を介して細胞移動性が増加することにより, 尿管の修復が促進すると示唆される。

#### O-19. 肝細胞におけるecto-ATPase活性に対するクルクミンの効果

藤井拓人, 皆川拓磨, 清水貴浩, 竹口紀見, 酒井秀紀 (富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学)

Ecto-ATPaseは, 細胞膜に存在するecto-nucleotidaseの一つであり, 細胞外ATPを分解することで, 細胞外ATPおよびアデノシン濃度の調節を行っている。Ecto-ATPase活性は組織に広く存在しているが, 肝臓における活性は特に高い。プリン作動性シグナルの調節を行う重要なATPaseでありながら, これまでその活性を低濃度で抑制する化合物はほとんど見つかっていない。本研究では, 肝細胞癌由来HepG2細胞のecto-ATPase活性について検討した。HepG2細胞のecto-ATPase活性は, EDTA (10 mM), DIDS (500 $\mu$ M), スラミン (1mM), 塩化亜鉛 (500 $\mu$ M), オルトバナデート (1mM)により有意に抑制された。次に, ecto-ATPase活性に対するクルクミンの効果を検討したところ, 低濃度 (IC<sub>50</sub>=6.2 $\mu$ M)で活性を阻害した。一方クルクミンは, ecto-ADPase活性およびecto-5'-nucleotidase活性に対しては, 30 $\mu$ Mでも阻害効果を示さなかった。本研究により, クルクミンの肝臓における多様な生理活性の一部には, ecto-ATPase活性の阻害によるプリン作動性シグナルの変化が関与している可能性が示唆された。

#### O-20. TRPP3チャネルのアルカリ感受性

清水貴浩<sup>1</sup>, 樋口大河<sup>1</sup>, 藤井拓人<sup>1</sup>, B Nilius<sup>2</sup>, 酒井秀紀<sup>1</sup> (<sup>1</sup>富山大学大学院医学薬学研究部(薬学)薬物生理学, <sup>2</sup>Department of Molecular Cell Biology, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium)

Transient Receptor Potential (TRP)チャネルファミリーは, 主としてCa<sup>2+</sup>透過型非選択性カチオンチャネルを形成し, 様々な化学および物理刺激を受容することが知られている。昨年の本会において, TRP Polycystin 3 (TRPP3)が約180pSのシングルチャネルコンダクタンスを示す電位依存性カチオンチャネルであり, 細胞容積変化により活性調節を受けることを報告した。本研究では, HEK293T細胞に強制発現させたTRPP3チャネルの細胞外アルカリ化に対する感受性について詳細に検討した。

細胞外溶液をアルカリ化 (pH 8-9)すると, pH依存的に

TRPP3 チャネル電流が亢進した。しかしながら、より強いアルカリ (pH10) は TRPP3 電流を抑制した。面白いことに、この強いアルカリを洗い流すことで、一過性の TRPP3 電流亢進が観測された。シングルチャネルレベルでの解析から、これらアルカリ化が、シングルチャネルコンダクタンスを変化させるのではなく、チャネルの開確率を調節することが明らかとなった。本研究結果から、TRPP3 チャネルが細胞外のアルカリ度を感受できるカチオンチャネルであることが示唆された。

#### O-21. 膵臓β細胞に発現する TRPM2 のインスリン分泌への関与

内田邦敏<sup>1,2</sup>、出崎克也<sup>3</sup>、B Damdindorj<sup>3</sup>、稲田 仁<sup>1</sup>、志内哲也<sup>2,4</sup>、森 泰生<sup>5</sup>、矢田俊彦<sup>3</sup>、箕越靖彦<sup>2,4</sup>、富永真琴<sup>1,2</sup> (1 岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理、2 総合研究大学院大学生理学、3 自治医科大学生理学統合生理学、4 生理学研究所生殖・内分泌発達機構、5 京都大学工学部合成生物化学)

インスリン分泌は生体で血糖を低下させる唯一の有効な手段であり、この分泌機能の破綻は高血糖を生じ、糖尿病を引き起こす。そのコントロールは基本的にはグルコースが行い、さらに多くの因子により厳密な調節を受けているが、そのメカニズムは未だ完全には明らかになっていない。

TRPM2 (Transient Receptor Potential Melastatin 2) はカルシウム透過性を持った非選択性陽イオンチャネルであり、所属研究室より体温近傍の温度で活性化されること、体温近傍温度条件下で cADPR によって活性化されることを明らかにした。さらに培養細胞を用いた検討により、特に消化管ペプチドによるインスリン分泌に TRPM2 が関与する可能性を報告している (Togashi et al. 2006)。

今回、TRPM2 のインスリン分泌への寄与を明らかにするため、TRPM2 ノックアウトマウスの解析を行った。TRPM2 ノックアウトマウスは WT マウスと比較し、空腹時において血糖値が有意に高値であったが、血漿中インスリン濃度に有意な差は認められなかった。16-17 時間絶食後にグルコースを投与する糖負荷試験を適用すると、TRPM2 ノックアウトマウスにおいてインスリン分泌異常に伴う高血糖が認められた。

膵臓β細胞における TRPM2 の役割を検討するために、TRPM2 ノックアウトマウスより単離した膵島及びβ細胞の検討を行った結果、グルコース及び消化管ペプチドに対する応答の低下がみられた。一方、K<sub>ATP</sub> チャネル阻害剤で K<sub>ATP</sub> チャネル依存性経路を刺激するトルブタミドに対する応答に違いは認められなかったことから、TRPM2 は K<sub>ATP</sub> チャネル非依存性経路に関与している可能性が考え

られた。

本研究により、膵臓β細胞に発現する TRPM2 は消化管からの情報だけでなく膵臓β細胞におけるグルコース代謝情報をも感知し、インスリン分泌を調節していることが明らかとなった。

#### O-22. 遅発性筋痛に対する TRPV1, V4 の関与について—ノックアウトマウスを用いた検討—

太田大樹<sup>1</sup>、那須輝顕<sup>2</sup>、加塩麻紀子<sup>3</sup>、富永真琴<sup>3</sup>、水村和枝<sup>1</sup> (1 名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II、2 目白大学保健医療学部、3 岡崎統合バイオサイエンスセンター細胞生理)

慣れない運動などの後に遅発性筋痛 (DOMS, 筋機械痛覚過敏) が生じることが知られている。本研究室では、伸張性収縮 (LC) 負荷による動物モデルを作製し、運動後に約 12 時間遅れて筋に発現する NGF が重要な役割を果たし、さらに TRP 受容体が関与することを明らかにした。しかし、NGF の下流でどの TRP 受容体が関与しているか不明である。そこで、まず TRPV1, V4 チャネル欠損マウス (KO) を使い、LC 負荷により DOMS が生じるか、また、NGF が筋痛覚過敏を生じるか調べた。

雄性両 KO マウス及び野生型マウス (C57Bl/6) に対し、マウス用収縮条件で LC 負荷を下腿後面筋群に対し 300 回負荷した。その前後において筋機械逃避反応閾値をランダルセリット装置により測定した。また、NGF-β (0.8μM, 5 μL) を腓腹筋外側頭筋に筋注し、同様に閾値測定を行った。

LC の結果、野生群の閾値は処置後 6 時間から 24 時間において有意に低下したが、TRPV1KO 群では変化しなかった。TRPV4KO 群では、LC 負荷 12 時間後に閾値が軽度低下した。NGF 筋注も同様に、TRPV1KO では痛覚過敏を生じず、TRPV4KO では軽度の痛覚過敏を生じる傾向を示した。以上より、TRPV1 が、DOMS 時に発現する NGF によって活性化され疼痛行動に寄与することが示唆された。TRPV4 の関与についてはさらに検討を続け、明らかにしたい。

#### O-23. 神経損傷モデルにおける筋痛覚過敏の検討

鈴木実佳子<sup>1,2</sup>、村瀬詩織<sup>2</sup>、水村和枝<sup>2</sup> (1 名古屋大学大学院医学系研究科手の外科学、2 名古屋大学環境医学研究所神経系分野 II)

【目的】腰痛、肩の痛みなどを訴える患者は多く、こうした慢性筋痛の一部は神経因性であると考えられている。今回、我々は神経損傷モデルにおいて筋痛覚過敏が生じるか調べた。また機械痛覚過敏を引き起こすことが知られている神経成長因子 (NGF) が、この筋痛覚過敏に関与してい



るか検討した。

【方法】ラットのL5脊髄神経を結紮後に切断する modified SNL モデル (SNL 群) と、sham 手術を行った群 (sham 群) の長指伸筋 (EDL: L4 支配) と腓腹筋内側頭 (GM: L5 支配) の機械逃避反応閾値 (RST) を Randall-Selitto 装置 (プローブ径 2.6mm) を用いて測定した。SNL 手術後 10 日目に抗 NGF 抗体を GM 内に筋注射し、同様に RST を測定した。免疫組織染色にて筋における NGF 産生細胞の同定を行った。

【結果】SNL 群は EDL, GM とも sham 群に比べて RST が低下し (筋機械痛覚過敏)、2 週間以上持続した。抗 NGF 抗体の筋注射により、低下していた GM の RST は 3 週間後から上昇したが、術前のレベルには至らなかった。EDL の RST は筋注射後も回復しなかった。NGF 様免疫活性は筋細胞には見られず、神経束の細胞に見られた。

【考察】SNL 手術によって生じた筋機械痛覚過敏には、一部 NGF が関与していると考えられる。NGF 産生細胞としては Schwann 細胞、線維芽細胞などの可能性が考えられる。

#### O-24. タウリンによる神経特異的イオン輸送体 KCC2 の活性制御

井上浩<sup>1</sup>、古川智範<sup>1</sup>、山田順子<sup>2</sup>、熊田竜郎<sup>1</sup>、王 天英<sup>1</sup>、福田敦夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浜松医科大学医学部生理学第一講座、<sup>2</sup>弘前大学医学部脳神経生理学)

KCC2 は  $K^+$  と  $Cl^-$  を汲み出し、 $[Cl^-]_i$  を低下させる神経特異的なイオン輸送体である。発達に伴ってその発現レベルが上昇し、成熟した神経細胞では  $GABA_A$  受容体やグリシン受容体が活性化すると  $Cl^-$  が細胞内に流入し、過分極が起こる。また、KCC2 の蛋白の存在にもかかわらず活性が抑制されているケースもいくつか報告されており、翻訳後の修飾もその機能調節に重要であることが示唆されている。我々は、KCC2 の活性制御をより詳細に検討するために、妊娠 15 日齢 (E15) ラットの胎仔脳内に子宮内電気穿孔法を用いて KCC2 を発現する遺伝子を導入し、電気生理学的手法を用いて KCC2 の活性を測定した。その結果、E18 では KCC2 は活性が抑制されているが、生後 1 日では活性があることを発見した。さらに、その原因を探索する過程で、タウリンがリン酸化依存的に KCC2 の活性を抑制する可能性を見出している。タウリンは、全身では抗酸化作用や浸透圧調節因子として働いていることが知られている。哺乳類では、妊娠時の羊水中に大量のタウリンが存在し、そのせいか、胎仔脳内にも出生後と比較して多量のタウリンが存在する。このように脳の発達におけるタウリンの重要性が示唆されているため、ヒトでは未熟児の栄養に積極

的にタウリンが投与されているが、その理由はいまだ明確になっていないと言え難い。今回のタウリンによる KCC2 活性制御という発見は発達におけるタウリンの意義を解明する上で大きな意義があると考えている。

#### O-25. 母体ストレスが胎仔の大脳皮質抑制性神経発達に及ぼす影響

内田 琢<sup>1</sup>、森島寿貴<sup>1</sup>、沖 隆<sup>2</sup>、柳川右千夫<sup>3</sup>、福田敦夫<sup>1</sup> (<sup>1</sup>浜松医科大学生理学第一講座、<sup>2</sup>浜松医科大学第二内科、<sup>3</sup>群馬大学医学部遺伝発達行動学講座)

胎児期の中枢神経発達段階で母体にストレスを受けると、胎児の脳機能発達に異常が見られ、様々な精神疾患になりやすいことが知られている。動物実験においても母体ストレスにより仔の認知学習機能が低下することが報告されている。ストレスによる在胎中の脳発達障害が疑われているが、そのメカニズムは不明である。ストレス脆弱性の臨界期は神経細胞が新生・移動して大脳皮質を形成する時期に一致し、また一方で大脳皮質神経細胞の発達や移動のわずかな変化が神経機能異常に影響を与える可能性も指摘されている。そこで我々は母体ストレスによって胎仔大脳皮質における神経細胞の新生や移動に影響を受けるのではないかと考えた。さらに GABA は未熟な細胞において興奮性の作用を示し、胎仔の大脳皮質発達に重要な役割を担っている。我々は母体ストレスによって胎仔大脳皮質における GABA 作動性神経細胞が受ける影響に注目した。この細胞の可視化を容易にするため、GAD67-GFP knock in マウスを用いて母体ストレスモデルマウスを作成し、母体ストレスの胎仔期大脳皮質発達への影響を調べた。その結果、ストレス中に新生した GABA 作動性神経細胞の数は減少したが、将来興奮性神経細胞として機能する細胞の新生・移動には影響が見られなかった。これらのことから、妊娠中のストレスによって胎仔の大脳皮質における正常な発達が阻害される可能性があると考えられる。

#### O-26. 生体脳において $GABA_A$ 受容体の活性化は大脳皮質辺縁帯 GABA 作動性神経細胞の多方向性移動を促進する

稲田浩之<sup>1,2</sup>、渡部美穂<sup>1</sup>、内田 琢<sup>3</sup>、福田敦夫<sup>3</sup>、柳川右千夫<sup>4</sup>、鍋倉淳一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所生体恒常機能研究部門、<sup>2</sup>総合研究大学院大学生理学専攻、<sup>3</sup>浜松医科大学生理学第一講座、<sup>4</sup>群馬大学医学研究科遺伝発達行動学分野)

大脳皮質 GABA 作動性神経細胞は発達初期に終脳腹側の基底核原基で産生され接線方向の移動を経て皮質板に到達する。我々は GABA 作動性神経細胞が皮質内に配置される過程を生体内で観察するために幼若期マウスの *in vivo*

イメージング法を開発した。抑制性神経細胞を選択的に蛍光標識するためにGAD67-GFPノックインマウスとVGAT-Venusトランスジェニックマウスを使用した。GAD67-GFPマウスは幼若期の脳皮質GABA含有量が野生型に比べて低いことが知られている。辺縁帯における移動様式を解析した結果、どちらの系統も多方向性の移動を見せた一方でその移動速度に有意差が認められた(VGAT-Venus>GAD67-GFP)。この結果から細胞外GABAが多方向性移動を調節している可能性が考えられた為そのメカニズムを検討した。薬理学的手法を用いてGABA<sub>A</sub>受容体の機能を阻害すると移動速度は減少した。また移動中の細胞にグラミシジン穿孔パッチクランプ法を用いてCl<sup>-</sup>の平衡電位を調べた所、GABAは脱分極性に作用することが明らかとなった。そこでCl<sup>-</sup>トランスポーターであるNKCC1の機能を阻害しCl<sup>-</sup>の平衡電位を過分極側にシフトさせたところ、移動速度は減少した。以上の結果からGABA<sub>A</sub>受容体の活性化は膜の脱分極を誘導することでGABA作動性神経細胞の多方向性移動を制御していると考えられる。

#### O-27. プレイオトロフィンのドパミン神経保護作用—*in vivo*での証明—

渡邊陽子<sup>1,2</sup>、清水由布子<sup>1</sup>、三角吉代<sup>1</sup>、増田 匡<sup>1</sup>、松永民秀<sup>2</sup>、鈴木 匡<sup>2</sup>、飛田秀樹<sup>1</sup> (<sup>1</sup>名古屋市立大学医学研究科脳神経生理学、<sup>2</sup>同 薬学研究科臨床薬学教育研究センター)

プレイオトロフィン (PTN) は、ドパミン (DA) 欠乏線条体で発現上昇するヘパリン結合蛋白質である。培養 DA 神経の生存促進作用、ES 細胞由来神経幹細胞の DA 分化促進作用、神経移植における効果をこれまでに報告した。しかし、PTN が DA 神経保護作用を有するか否かについてまだ明らかになっていない。本研究では *in vitro* および *in vivo* での DA 神経保護作用の有無を明らかにすることを目的とした。

*in vitro* での PTN 効果を確認するため、E15 ラット中脳より DA 神経を培養した。まず、培養 5 日後に 6-OHDA (0-40 $\mu$ M) を処置し、濃度依存的にチロシン水産化酵素 (TH) 陽性細胞が減少することが分かった。次に、PTN (100ng/ml) の前投与により、6-OHDA (20 $\mu$ M) による TH 陽性細胞数の減少が優位に抑制されたことも分かった。*in vivo* 効果を確認するため、浸透圧ポンプを用い黒質部へ PTN (0.5 $\mu$ l/hr, 50 $\mu$ g/ml) の前投与を行い、その 12 時間後に 6-OHDA (20 $\mu$ g) を線条体の 2 カ所へ投与し、PTN の神経保護作用を調べた。生食持続投与群では、メタンフェタミン投与により 6OHDA 投与側への著しい誘発回転運動

が認められるのに対し、PTN の投与群では誘発回転運動の著しく減少が認められた。

以上の結果から、PTN の DA 神経保護作用が *in vitro* および *in vivo* で確認された。

#### O-28. レプチン抵抗性は過食をもたらさない

樋口 隆、水野敬子、市丸 徹、成田和己、村田拓也 (福井大学医学部統合生理学)

レプチンは脂肪組織から分泌されて、摂食抑制とエネルギー消費の亢進をもたらすホルモンである。肥満状態では、血中レプチン値が高い。つまり、レプチンが効かない状態 (レプチン抵抗性) であるとされている。レプチン抵抗性では、レプチンの摂食抑制作用も働かないので、食欲が亢進して、過食になると考えられている。本研究では、レプチン抵抗性になったラットで、実際に摂食量が増加するか否かを検討した。

普通食から高脂肪食 (HFD) に変更すると、一過性に摂食量が増加するが、その後徐々に摂食量は減少し、摂取カロリーで通常食と同じ (摂取重量は減少) 状態で一定になる。5 週間以上 HFD で飼育すると、脳室内にレプチンを投与しても、摂食量は抑制されなくなる。つまりレプチン抵抗性が発現した。しかし、レプチン抵抗性が発現する前後で、摂食量が増加することはなかった。さらに、レプチン抵抗性ラットを 10 日間、普通食に戻すと、この間に摂食量は増加した。このラットに再び HFD を与えると、一過性に摂食量が増加してその後減少する。レプチン感受性ラットと同じ摂食パターンを示した。また、レプチン抵抗性ラットの脳室に、レプチンの摂食抑制作用経路の一部と考えられているメラノコルチン受容体のアゴニスト (melanotan II) を、腹腔内にコレシストキニンを投与したが、両者の摂食抑制作用は、コントロールのラットと差がなかった。

以上の結果から、レプチン抵抗性は過食をもたらさないと結論づけた。

#### O-29. 作業記憶力向上に関わる神経基盤の脳波学的研究

山室俊二、榊原吉一 (金沢工業大学心理情報学科)

作業記憶 (WM) は、一次的記憶保持と情報処理を同時に遂行するために、対象への意識の集中、長期記憶や感覚中枢とのやりとりなど多くの部位との動的な統合を必要としている。WM 成績はダーツ実技や言辞的褒賞によって向上することが分かっている。しかしながらその能力向上の神経基盤は不明である。我々は WM 能力の向上ないし低下は神経基盤の場所または活動性の変化と対応するのではないかと考えた。本実験では、ダーツ実技を用いて、平均 22

才の男性被験者 11 人に対しダーツ実技前後の 3-back 一致課題得点 (WM 課題) と WM 課題中における自発脳波について 10-20 電極法を用いて計測した。脳波の AD 変換周波数は 500Hz とし、パワー計算には重畳率約 50% で毎 2 秒の DFT を用いた。本 WM 課題に無為の回答をしたと判定された 3 人と脳波データに致命的ノイズ混入を招いた 2 人を除いた 6 人に対し解析を行った。その結果、WM 得点の前後比と有意な相関性を示した各脳波帯域の電極部位は、 $\theta 2$  が T6 と P4 ( $p < .05$ )、 $\alpha 2$  が F7 ( $p < .05$ ) であった。しかし、Fz の  $\theta$  (Fm $\theta$ ) には相関性が無かった。これらの結果は、ダーツによる WM 成績変化は左前頭葉と右後頭葉が関与していたこと、他方、Fm $\theta$  の関与は殆どなかったことを示している。また WM 自身、及びその能力の変化を支える脳基盤について考察をした。

### P-1. ゲニステインは CFTR を介して培養心室筋細胞の低酸素/再酸素化による傷害を防御する

浦本裕美, 岡田泰伸 (生理学研究所機能協同部門)

CFTR は cAMP/PKA 依存性クロライドチャンネルであり、ゲニステインは細胞内 cAMP 量が少量存在する状態で CFTR に直接作用し CFTR チャンネル活性を亢進する。我々はこれまで *in vivo* 虚血・再灌流実験で梗塞サイズを調べる方法により、ゲニステインの虚血前投与あるいは再灌流開始時投与が心筋の虚血・再灌流傷害を防御し、その効果は CFTR を介することを CFTR ノックアウトマウスの実験も加え明らかにしてきた。しかし、ゲニステインは CFTR チャンネル活性化剤として作用するだけでなく、エストロジェンレセプターに作用したり、チロシンキナーゼの阻害剤としても作用することが知られている。

本研究ではこれらの防御効果に加わった可能性を *in vitro* 実験系で検討した。単離・培養した新生仔ラット心室筋細胞を低酸素環境に 1 時間曝し、2 時間再酸素化したのちに、PI 染色で確認したネクロシス性細胞死率へのゲニステイン効果が *in vivo* 実験結果と非常に近い結果となることを確認した。また、再酸素化 5 時間後に測定したカスパーゼ 3/7 活性は両者間で差は無かった。同条件でエストロジェンレセプター阻害剤の ICI 182,780 とチロシンキナーゼ阻害剤の AG18 の影響は見られず、ゲニステインの構造アナログであるダイドゼインはゲニステインと同様の細胞死抑制効果を示した。これら結果から、ゲニステインのネクロシス性細胞死抑制効果は主として CFTR チャンネルを介するものと結論された。

### P-2. Kv1.2 チャンネルの脱活性化の細胞外 K<sup>+</sup>濃度依存性

藤井大祐<sup>1,2</sup>, 久保義弘<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>生理学研究所神経機能素子研究部門, <sup>2</sup>総合研究大学院大学生命科学研究科生理科学専攻)

Kv1.2 は膜電位依存性 K<sup>+</sup>チャンネルの *Shaker* サブファミリーに属する分子である。Kv1.2 について、脱分極時の活性化の速度、およびコンダクタンス-膜電位関係が大きく異なる二つのモードをとること、そして S2-S3 リンカーに存在する Thr252 を Arg に置換すると slow gate モードが消失することが報告されている (Saman et al., 2007)。我々は、マウス Kv1.2 をツメガエルの卵母細胞に発現させ、二本刺し膜電位固定法による解析を行い、高 K<sup>+</sup>濃度 (90mM) の外液中において、活性化した Kv1.2 の深い電位での脱活性化が極めて緩徐であること、脱活性化電流が指数関数でフィットできない特徴的な挙動を示すことを見だし、また、脱活性化の速度が外液の K<sup>+</sup>濃度に依存して変化することを観察した。次に、緩徐な脱活性化と活性化のモードシフトとの関係にアプローチするために Thr252Arg 変異体の脱活性化を解析したところ、野生型との明確な違いは見られず解析を継続している。さらに、Kv1.2, *Drosophila* の *Shaker* チャンネルではこの現象が観察されるが、Kv2.1, Kv3.2 では観察されないことから *Shaker* サブファミリーに特有の性質であることが示された。以上の結果は、Kv1.2 の脱活性化が膜電位のみでなく細胞外 K<sup>+</sup>によっても制御される複雑なプロセスであることを示唆する。

### P-3. 温度受容体 Transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3) イオンチャンネルの機能進化：哺乳類とニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) における逆向きの温度感受性

齋藤 茂<sup>1</sup>, 新貝御蔵<sup>2</sup>, 富永真琴<sup>1,3</sup> (<sup>1</sup>岡崎統合バイオ生命環境細胞生理, <sup>2</sup>岩手大学工学部応用化学生命工学, <sup>3</sup>総合研究大学院大学生理学)

温度受容体である温度感受性 TRP イオンチャンネルは進化過程において動物が温度環境に適応する際に重要な役割を担ったと考えられる。TRPV3 イオンチャンネルは哺乳類において皮膚に発現する温かい温度 (>33°C) の受容体であり体温調節に関与している。本研究では温度受容体の機能進化を解明するため両生類であるニシツメガエルの TRPV3 遺伝子を単離し、そのイオンチャンネル特性を調べた。各脊椎動物種の TRPV3 イオンチャンネルのアミノ酸配列を比較したところ、ニシツメガエルでは両端の領域が他の陸上脊椎動物と比べて著しく異なっていた。アフリカツメガエル卵母細胞にニシツメガエル TRPV3 イオンチャンネルを発現させたところ、哺乳類のアゴニストである 2-APB により活性化された。次に、温度感受性を調べたところ、ニシツメガエル TRPV3 イオンチャンネルは温かい温度では

活性化されなかったが、一方、16℃以下の低温で活性化され、哺乳類とニシツメガエルでは逆向きの温度変化に感受性があることが示された。18-20℃以下の温度域はニシツメガエルには致死的であること、また、皮膚に発現することはニシツメガエル TRPV3 イオンチャネルが侵害性の低温の受容にかかわることを示唆している。本研究により脊椎動物の進化系統で TRPV3 イオンチャネルの温度感受性が生理的な特性に適應するように変化したことが示された。

#### P-4. 睡眠覚醒調節におけるオレキシン神経とセロトニン神経の役割について

山中章弘<sup>1,2,3</sup>、常松友美<sup>1,2,3</sup>、田淵紗和子<sup>1,2,3</sup>、富永真琴<sup>1,2,3</sup> (1)生理学研究所細胞生理研究部門、(2)岡崎統合バイオサイエンスセンター、(3)総合研究大学院大学生理学)

本研究は睡眠覚醒調節における視床下部のオレキシンを産生する神経(オレキシン神経)と縫線核セロトニン神経との役割について、個体を用いた特定神経の光操作によって明らかにしている。

視床下部のオレキシン神経は睡眠覚醒調節において重要な役割を担っている。オレキシン神経は縫線核セロトニン神経に密に投射し活性化する。一方、セロトニン神経はオレキシン神経に投射し抑制することが分かっている。これらの神経回路はネガティブフィードバック回路として機能すると考えられるが、睡眠覚醒の発現においてどのように機能するのかについてはよく分かっていなかった。そこで、個体を用いてこの神経回路機能を明らかにするために、オプトジェネティクスを用いて意識下においてオレキシン神経活動を操作し、その時の縫線核セロトニン神経活動を同時に細胞外記録によって記録した。覚醒下においてオレキシン神経活動を急性抑制すると、脳波は徐波成分の増加を示し、セロトニン神経活動は徐波睡眠時と同程度に低下した。このことは、縫線核セロトニン神経活動がオレキシン神経活動に大きく依存していることを示唆している。しかしながら、オレキシン神経を除去した遺伝子改変マウスでは、縫線核セロトニン神経活動は覚醒時、徐波睡眠時、レム睡眠時のいずれにおいても野生型マウスと同じであったことから、急性抑制とは神経活動の制御が異なっていることが明らかとなった。

#### P-5. サルの海馬シータ波と睡眠ステージ

田村了以<sup>1</sup>、西田 悠<sup>1,2</sup>、永福智志<sup>1</sup>、永尾 薫<sup>1</sup>、伏木宏彰<sup>2</sup>、渡辺行雄<sup>2</sup> (1)富山大学医学薬学研究部(医学)統合神経科学、(2)富山大学医学薬学研究部(医学)耳鼻咽喉科頭頸部外科学)

これまでげっ歯類動物を用いた研究より、海馬シータ波

は情報の符号化や長期的な保持に重要な役割を果たすことが示されてきた。海馬シータ波と行動との相関は動物により異なるが、多くの非霊長類動物では、REM 睡眠時に明瞭なシータ波が持続的に出現する。しかしヒトを含め霊長類では、海馬シータ波と睡眠ステージとの関連を調べた研究はほとんどない。今回われわれは、サルを用いてこの問題を検討した。

2頭のサルの海馬歯状回門部から覚醒期および睡眠期に脳波を記録したが、覚醒/睡眠の全てのステージを通して、明瞭かつ持続的なシータ波は観察されなかった。各覚醒/睡眠ステージでの海馬脳波を高速フーリエ変換法を用いて解析したところ、シータ周波数帯の振幅は覚醒期と比較して、non-REM 睡眠では軽度増加したが(睡眠ステージ I-II で1.5倍、睡眠ステージ III-IV で1.6倍)、REM 睡眠では増加しなかった。また、短持続(<1秒)のシータ振動の出現頻度は、覚醒期と比較して、non-REM 睡眠では増加したが(睡眠ステージ I-II で4.5倍、睡眠ステージ III-IV で6.3倍)、REM 睡眠では減少した(0.44倍)。以上の結果より、サルでは海馬シータ波が、non-REM 睡眠時に増加する傾向はあるがREM 睡眠時にはほとんど出現せず、霊長類と非霊長類の間に動物種差のあることが明らかとなった。

#### P-6. 随意動作発現に伴う交感神経活動への中枢性運動指令と認知機能の関与

桑原裕子<sup>1</sup>、塚原玲子<sup>2</sup>、岩瀬 敏<sup>1</sup>、清水祐樹<sup>1</sup>、西村直記<sup>1</sup>、青木 久<sup>2</sup>、菅屋潤壹<sup>1</sup> (1)愛知医科大学生理学第2講座、(2)愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所機能発達部)

【目的】運動関連脳電位(MRCPs)と体性感覚誘発電位(SEPs)を用いて随意動作発現に伴う交感神経活動への中枢性運動指令や認知機能の関与を調べることを目的とした。

【方法】健全な成人男性10名を対象にし、Goシグナルによる随意的掌把運動と電気刺激による誘発性掌把運動に関して、脛骨神経からの皮膚交感神経活動(SSNA)、足底の交感神経皮膚反応(SSR)とともに橈側の前腕屈筋群の筋電図および脳波(Fz, Cz, Pz, C3, C4)を記録した。脳波は筋電図の開始をtriggerとして加算平均し、中枢性運動指令や視覚によるGoシグナルの認知および筋収縮による体性感覚の認知を調べるために運動関連脳電位(MRCPs)と体性感覚誘発電位(SEPs)の振幅を分析した。SSNAについてMRCPsおよびSEPsとの振幅の相関を調べ、さらに運動指令の関与の有無を示唆する筋電図の前後にSSNAが発現する試行を2群化して比較した。また、精神性発汗の指標であるSSR反応の発現の有無により試行を2群化

し、MRCPs と SEPs の振幅を比較した。

【結果】SSNA は運動準備電位 (BP, NS') や運動電位 (MP) と振幅の相関が認められ、運動指令の関与の有無による 2 群間の SSNA 振幅に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。SSR の発現する群と発現しない群の比較では MP の振幅に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

【結論】随意動作に伴う交感神経活動の出力には視覚による Go シグナルの認知や筋収縮による体性感覚の認知の関与より中枢性運動指令の関与のほうが大きいと考えられる。

#### P-7. トレッドミル運動がギプス固定により出現する長期の機械的痛覚増強に及ぼす影響

森本温子<sup>1,3</sup>, 大道裕介<sup>1,2</sup>, 櫻井博紀<sup>1,4</sup>, 吉本隆彦<sup>1,5</sup>, 大道美香<sup>2</sup>, 橋本辰幸<sup>1</sup>, 山口佳子<sup>1</sup>, 牛田享宏<sup>1</sup>, 岡田忠<sup>3</sup>, 熊澤孝朗<sup>1</sup> (愛知医科大学医学部学際的痛みセンター, <sup>2</sup>愛知医科大学医学部解剖学講座, <sup>3</sup>愛知医科大学医学部生理学第一講座, <sup>4</sup>浜松大学保健医療学部, <sup>5</sup>愛知医科大学医学部生理学第二講座)

2 週間の片側下肢ギプス固定後、固定部下肢の発赤、腫脹・浮腫、熱感に続き、固定部を超えて拡がる長期の機械的痛覚増強が誘発されることを報告した(大道ら 2005)。本研究では、この機械的痛覚増強に対する運動負荷の影響を検証した。ラットに骨盤部から片側足部まで 2 週間のギプス固定を行った。運動群 ( $n = 14$ ) と非運動群 ( $n = 8$ ) を設定し、運動群はギプス除去後 3 日から 2 週まで低強度トレッドミル運動 (頻度 3 日/週, 時間 30 分/日, 速度 12m/分) を負荷した。機械的痛覚テストは、固定部直下 (下腿皮膚, 腓腹筋部), 固定部近傍 (足底), 固定部遠位 (尾) に対して、ギプス除去後 2 時間から 10 週まで行った。下腿皮膚・足底・尾には von Frey hair Test, 腓腹筋部には push-pull gauge を用い圧痛閾値の測定を行った。非運動群ではギプス除去後 2 時間から下腿皮膚・腓腹筋部・足底、遅れて 2 週から尾の痛覚増強が出現し、それぞれ 10 週まで持続した。運動群では、下腿皮膚・腓腹筋部で運動負荷終了後 4~5 週間で痛覚増強が両側性に減弱したが、その後再び出現した。足底 (両側) では両群間に差は認められなかった。尾では痛覚増強の出現が 3 週遅延した。今回の運動負荷では、各部位の痛覚増強に対し 1) 一定期間の減弱 (下腿皮膚・筋), 2) 遅延 (尾), 3) 影響なし (足底) という影響の違いを認めた。

#### P-8. 猫舌に関する舌血流と受容閾値に関する研究

平瀬 翔<sup>1</sup>, 阪中英里加<sup>1</sup>, 水野 優<sup>3</sup>, 西村直記<sup>2</sup>, 清水祐樹<sup>2</sup>, 岩瀬 敏<sup>2</sup>, 菅屋潤壹<sup>2</sup> (愛知医科大学医学部医学

科, <sup>2</sup>愛知医科大学生理学第二講座, <sup>3</sup>東京大学情報理工学系研究科)

#### 【始めに】

いわゆる「猫舌」は育児・食生活などに大きな影響をもたらすが、その研究はこれまであまり行われてこなかった。そこで、そもそも「猫舌」がどのようなものであるかを調べるため、「猫舌」のヒトとそうでないヒトに対して舌の温度閾値と舌の熱拡散に関与すると推測される舌血流を計測定し、更にポリモーダル受容器に痛覚刺激とともにそれぞれ温覚、冷覚刺激をもたらすメントール、カプサイシン (タバスコ) を用いて舌における感覚の鋭敏度を測定した。

#### 【方法】

男女無作為に自称「猫舌」2 名を含む計 9 名の被験者を選び各自の舌の温度受容感覚と舌血流を前者はベルチエ、後者はレーザードップラーを用いて測定した。メントールとカプサイシンは綿棒で舌上に塗布し「辛さ」の感覚を最大 100、最小 0 の目盛りから申告してもらった。T 検定により「猫舌」とそうでない被験者の間で有意な差があるか調べた。

#### 【結果・考察】

舌の温度受容に関して自称「猫舌」とそれ以外の被験者では差が見られなかった。

舌血流、カプサイシン、メントールとも単体では「猫舌」とそれ以外では大きな差は得られなかった。カプサイシンは特に無関係と考えられる。しかしメントールに関しては関与が疑われ、またグラフを一見すると舌血流とメントールの複合が考えられる。即ちメントールに対して鋭敏、或いは舌血流の少ないヒトほど「猫舌」だと訴えやすいということである。以上から猫舌には温度感覚より痛覚刺激のほうがより重要だと考えられる。

#### P-9. Effects of acclimation to heat on the responses of immune and hormonal parameters to passive heating in healthy volunteers

D Kanikowska, M Sato, S Iwase, N Nishimura, Y Shimizu, Y Inukai, J Sugeno (Department of Physiology, Aichi Medical University School of Medicine)

Heat acclimation results in whole body-adaptations that increase heat tolerance and, in addition, may result in changes in immune responses. We hypothesized that, after heat acclimation, tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 and the lymphocyte count would decrease. Heat acclimation was induced in 6 healthy men by 100 min exposure for 9 days. This was achieved by 1) a 10-min phase of chest-level water immersion in water at 42°C, and 2) a 90-min

phase of passive heating by a warm blanket to maintain tympanic temperature at 37.5°C. The climatic chamber was maintained at 40°C and a relative humidity of 50%. Blood samples were analysed for NK cell activity, counts of lymphocytes B and T, peripheral blood morphology, interleukin 6, tumor necrosis factor alpha and cortisol in pre- and post- heat acclimation sessions. A Japanese version of the profile of mood states, a mood questionnaire, was administered during the pre- and post-heat acclimation time. The concentrations of: white blood cell, lymphocytes B and T, cortisol, interleukin 6 or tumor necrosis factor alpha as well NK cell activity showed no significant differences between pre- and post-acclimation. There were significant differences in the platelet count with lower count on the post-acclimation day. In the profile of mood states questionnaire, there were significant differences among the pre-acclimation and post-acclimation days for anger in the specific mood subscale, with higher scores post-acclimation. It is concluded that heat acclimation by passive heating does not induce alterations in immune-endocrine responses.

#### P-10. Klotho 依存的な急速体液カルシウム恒常性制御

村田宮彦<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>先端医療振興財団, <sup>2</sup>京都大学医学研究科)

カルシウム低下に抗する体液のカルシウム恒常性は, parathyroid hormone (PTH), 活性型ビタミン D (VD) を介したホルモン性の制御で行われていることは周知の事実であるが, それ以外にも腎臓自律的な速い制御が無視できない強さで存在することをマウス個体を用いて明らかにする. カルシウム低下実験において腎臓を挟んだ前後の血液サンプルの定量から, 腎臓を通過する過程で, 低下しているカルシウムは秒~分のオーダーで強力に上昇させられることが示された. さらに, この恒常性制御機構は,  $\alpha$ klotho<sup>-/-</sup>マウスと  $\alpha$ klotho<sup>+/+</sup>マウスを使った実験から,  $\alpha$ Klotho 依存性を持つことが明らかになった.  $\alpha$ Klotho は Na ポンプの活性制御を介して PTH の低カルシウムに反応した分泌に必須なタンパクであると考えられており, また, FGF23 の co-receptor として VD の産生に抑制的に働くことが知られている. 興味深いことに, 単一分子が上記 3 種類の異なるカルシウム恒常性維持に異なる効果の方向性, 異なる時間, 異なるメカニズムで関与することを示す.

#### P-11. Physarum 変形体における頻回電気刺激に対する回避行動

海老根雅人<sup>1</sup>, 加藤修一<sup>2</sup> (<sup>1</sup>帝京平成大学大学院情報学研究所, <sup>2</sup>帝京平成大学大学院情報学研究所)

Physarum polycephalum の感電性は, 電気刺激側パラメータとして, 振幅, 頻度, 位相, 波形と関連があると考えられるが, 本研究では Physarum の頻回電気刺激に対する回避行動を調べた. 実験には 1cm×1cm の Physarum 変形体を用い, 1cm の寒天経路の両端にオートミール (誘引刺激) と電気刺激 (嫌悪刺激) 用電極を配置した. 通電は電極上に Physarum を置き, 出発側及び到着側で交互に通電し, 反対側には誘引刺激を置いた. 電気刺激には電極からの移動距離 1cm 以内で 0.5V, それ以降は 0.2V の電位差勾配を利用した. その結果, 初回通電と 2 回目通電の移動時間は, それぞれ 50 サンプルで平均 7.5 時間 (±2.4), 6.3 時間 (±1.3) となった (15% 短縮). 誘引刺激だけを与えたコントロール群では 15 サンプルで往路, 復路の移動時間は, それぞれ平均 10.7 時間 (±2.0), 11.0 時間 (±1.8) で短縮は認められなかった. また, 通電前後で Physarum の運動における位相反転が認められた. 前報では, Physarum への管状葉脈の直接通電では被刺激葉脈の収縮, 原形質流量及び周期の短縮, 通電後の膜電位に続く静止電位の上昇が認められた. このような知見は Physarum の感電性との関係を示唆しているものと考えられる.

#### P-12. 培養脊髄神経節アストロサイトの神経伝達物質刺激によるイオンチャネル開口とレセプター

鈴木和夫, 掛あかり, 三石哲也, 佐藤洋介, 仙洞田佳悟, 嶋田大祐, 秦寛樹, 小松崎達也, 清水春希, 須賀田敏幸 (東海大学開発工学部医用生体工学科)

最近, 中枢神経系のグリア細胞に各種の K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>チャネルが発見され神経シグナル伝達におけるその役割について興味ある提案がされている. 脊髄神経節 (DRG) は感覚神経の通過路であり DRG 内のグリア細胞, 特にアストロサイトが感覚シグナルへどのように影響を与えているか興味を持たれるところである. 培養系は, 生体内と異なる可能性があるが我々は DRG よりアストロサイトを培養してその電気生理学的性質, 特にイオンチャネル, 神経伝達物質による応答, 及びそのレセプターについてパッチクランプ法を用いて調べたので報告する. 7 週齢マウスの DRG を摘出しニューロンとグリア細胞を分離して培養した. アストロサイトはほとんど多角形タイプで GFAP 陽性であり, 膜電位は -30~-40mV であった. イオンチャネルは二種の Cl<sup>-</sup>チャネル及び K<sup>+</sup>チャネルが観察された. Cl<sup>-</sup>チャネルはコンダクタンス 30~40pS (low-conductance Cl<sup>-</sup> channel) と 370~390pS (high-conductance Cl<sup>-</sup> channel) で両チャネルとも電圧活性は見られなかった. K<sup>+</sup>チャ

ネルはコンダクタンス 50~70pS で電圧活性はなく  $\text{Ca}^{2+}$  活性があった。パッチクランプ cell-attached モードでグルタミン酸 (GA) を容器溶液に投与すると二つの  $\text{Cl}^-$  チャンネルがオープンすること、さらに膜透過性の cyclic AMP を投与すると high-conductance  $\text{Cl}^-$  channel がオープンすること、そして ATP 投与で  $\text{K}^+$  チャンネルがオープンすることがわかった。次に whole-cell モードで膜電位応答とレセプターを調べた。GA は non-NMDA レセプターを介して反応すること、ATP は  $\text{P}_2$  レセプターを介して過分極応答を誘起することが示された。今後これらの刺激が神経シグナル伝達にどう影響するか検討する必要がある。

### P-13. マウス大腸におけるクロライド吸収機構の検討

長井宏樹, 林 久由, 鈴木裕一 (静岡県立大学大学院生活健康科学研究科生理学)

#### [目的]

大腸における主要な  $\text{Cl}^-$  吸収は  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  交換輸送体 (SLC26A3) で担われていると考えられており、また SLC26A3 の遺伝子異常は先天性  $\text{Cl}^-$  下痢症の原因であることが示されている。しかし、大腸各部位での詳細な  $\text{Cl}^-$  吸収機構は検討されていない。このため、本研究では大腸における  $\text{Cl}^-$  吸収機構を解明するために SLC26A3 欠損マウスを用い、野生型マウスと比較検討した。

#### [方法]

大腸 (盲腸, 近位結腸, 中位結腸, 遠位結腸) 各部位の内容物を採取し、pH と  $\text{Cl}^-$  濃度を測定した。また、各部位の粘膜標本を Ussing chamber に装着し  $^{36}\text{Cl}^-$  の一方向性のフラックスを測定した。

#### [結果及び考察]

腸管内容物の pH は大腸各部位で野生型マウスに比べ SLC26A3 欠損マウスで低い傾向が観察され、SLC26A3 欠損マウスではアルカリ分泌の低下または酸分泌の亢進が示唆された。野生型マウスにおける  $\text{Cl}^-$  濃度は盲腸では約 20 mM で、近位結腸では約 70mM であり遠位部では約 30mM に低下していた。SLC26A3 欠損マウスでは盲腸から遠位結腸にかけて約 150mM と高値であり、 $\text{Cl}^-$  吸収が低下していることが示唆された。野生型マウスでは  $^{36}\text{Cl}^-$  を用いた盲腸, 中位結腸, 遠位結腸での粘膜側から漿膜側へのフラックスが漿膜側から粘膜側へのフラックスより大きく、 $\text{Cl}^-$  の吸収が起こっていることが示唆され、近位結腸では両方向のフラックスがほぼ同等で  $\text{Cl}^-$  吸収は起きていないことが示唆された。SLC26A3 欠損マウスでは盲腸, 中位結腸, 遠位結腸で粘膜側から漿膜側へのフラックスが減少しており、SLC26A3 が盲腸, 中位結腸, 遠位結腸で  $\text{Cl}^-$  吸収に関与していることが示唆された。

### P-14. 植物由来リコピン含有飲料の摂取が運動後の尿中 8-OHdG 排泄量に及ぼす影響

藤田公和<sup>1</sup>, 加藤恵子<sup>2</sup>, 野中章臣<sup>3</sup>, 脇坂康彦<sup>4</sup>, 黒柳淳<sup>5</sup> (<sup>1</sup>桜花学園大学, <sup>2</sup>名古屋文理大学短期大学部, <sup>3</sup>一宮女子短期大学, <sup>4</sup>愛知江南短期大学, <sup>5</sup>修文大学)

【目的】8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (以下、8-OHdG) は、DNA 中の deoxyguanosine の 8 位がヒドロキシル化された構造を持つ DNA 酸化損傷マーカーの 1 つである。細胞の DNA 中に形成された 8-OHdG は、DNA 修復酵素の作用によって遺伝子 DNA から切り出された後細胞外へ放出され、血液中を経て尿中に排泄される。そのため、尿分析によって非侵襲的に生体内酸化ストレスを評価できる。トマトやスイカなどの赤い色素であるリコピンは強力な抗酸化作用、活性酸素消去作用を持っていることが既によく知られている。本研究では、女子大学生にリコピンを含むトマトジュースを日常的に摂取させ、身体運動実施前後の尿中 8-OHdG 量を測定することによって、リコピンの摂取が運動に伴う生体内 DNA の損傷を抑制できるかどうか検討した。

【方法】バスケットボール部所属の女子学生 20 名をトマトジュース摂取群 (9 名) と対照群 (11 名) に分けた。トマトジュース摂取群は毎日 300ml のトマトジュースを 3 週間にわたって摂取した。身体運動として、バスケットボールの練習試合を約 3 時間実施した。ウォーミングアップ前と試合終了後 30 分に採尿し、尿中 8-OHdG 含有量は ELISA 法で分析した。

【結果および考察】運動前の尿中 8-OHdG 含有量は、トマトジュース摂取群が  $7.73 \pm 2.45 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$ 、対照群は  $7.55 \pm 1.56 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$  であり正常範囲の数値であった。運動終了後にはトマトジュース摂取群は  $8.13 \pm 2.19 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$  であったが、対照群では  $9.62 \pm 2.53 \text{ ng/mg} \cdot \text{Cr}$  まで増加し、対照群の運動前後で 5% 水準の有意差が認められた。従って、尿中 8-OHdG 含量を生化学的マーカーとした場合、3 時間程度のバスケットボール運動が生体へ酸化傷害を与えること、運動前 3 週間にわたって摂取したトマトジュースに含まれるリコピンが、運動による生体への酸化傷害を軽減できたことが示唆された。

### P-15. LPS 活性化ミクログリアにおける酸化ストレス制御機構の解明

金子葉子, 中島 昭, 森 啓至, 太田 明 (藤田保健衛生大学医学部生理学 I)

近年、神経変性疾患と活性化ミクログリアの関連を示唆する報告が多く認められる。我々は、通常は単離後 3 日間程度で死滅する初代培養マウスミクログリアが、LPS に

よって1ヶ月以上生存することを発見した。LPS 活性化ミクログリアの長期生存が神経変性疾患に何らかの関連性があると考え、長期生存の原因を検討した結果、LPS 活性化ミクログリアにおいては、アポトーシスおよびオートファジーが抑制されていることを既に明らかにしている。

一方、LPS により生じる酸化ストレスが、LPS 活性化ミクログリアにおいてどのように制御されているかについてはまだ明らかにしていない。そこで、LPS 活性化ミクログリアにおける酸化ストレスの制御について解析した。

0.1 $\mu$ g/ml LPS をマウス初代培養ミクログリアに添加すると、4 時間後には活性酸素種(ROS)の生成が認められた。一酸化窒素合成酵素(iNOS)は1 日後にタンパク質の発現が認められ、それに伴って一酸化窒素(NO)の合成が認められた。これら进行处理すると考えられるSOD-1 およびSOD-2 のタンパク質は、それぞれ16 時間後、1 日後に有意に増加した。以上の結果から、LPS 活性化ミクログリアにおいては、酸化ストレスによる毒性がSOD-1, SOD-2 によって制御されているために長期生存が可能であると考えた。

#### P-16. lipopolysaccharide 投与により成体マウス側脳室下帯でアポトーシスが誘導される

森 啓至, 金子葉子, 中島 昭, 太田 明 (藤田保健衛生大学医学部生理学 I)

**【目的】** 成体の大脳側脳室下帯領域 (SVZ) には多数のアストロサイトが存在する。また、同部位にはアストロサイト由来の神経幹細胞 (NSCs) が存在し、NSCs から増殖した細胞が嗅球および海馬の機能維持に関与していると考えられている。一方、アストロサイトは中枢神経系においてミクログリアと共に炎症性サイトカインを産生し、種々の炎症性病態に関与している。我々は、全身性の炎症状態において、SVZ とその周囲に存在するアストロサイトが NSCs による嗅球の機能維持に何らかの影響を与えているものと推察し、炎症モデルマウスを用いて当該部位での tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  産生量の変化とアポトーシス誘導について検討を行った。

**【方法】** 実験には C3H/HeN (LPS 感受性マウス), C3H/HeJ (TLR4 欠損マウス), C57BL/6, C57BL/6 由来 TNF 受容体欠損マウスを利用した。各マウスに lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与し、2 時間もしくは 24 時間後の脳を用いてパラフィン切片および凍結切片を作成した。アポトーシスの検出には TUNEL 染色および抗活性化型 caspase-3 抗体を用いた。また、抗 TNF- $\alpha$  抗体、抗 GFAP 抗体、抗 Iba-1 抗体、抗 DCX 抗体を用いて免疫染色を行った。

**【結果と考察】** LPS 投与 24 時間後の SVZ および SVZ か

ら嗅球へ幼若細胞が移動する経路 (RMS) において、アポトーシスを起す DCX 陽性細胞が有意に増加した。また、LPS 投与 2 時間後には、アストロサイトからの TNF- $\alpha$  の産生量が増加していた。一方、C3H/HeJ および TNF- $\alpha$  受容体欠損マウスでは、アポトーシスの増加は認められなかった。以上の結果から、LPS の腹腔内投与により、アストロサイト由来の TNF- $\alpha$  が起因するアポトーシスの誘導が、側脳室下帯領域の幼若細胞において増加する可能性が推察された。

#### P-17. ドーパミンはヒト杆体視細胞の膜電位応答を修飾する

河合房夫<sup>1</sup>, 堀口正之<sup>2</sup>, 宮地栄一<sup>1</sup> (<sup>1</sup>藤田保健衛生大学医学部生理学 II, <sup>2</sup>藤田保健衛生大学医学部眼科学)

$I_h$  電流 ( $I_h$ ) は、様々な標本において生理学的に重要な働きをしていることが知られている。心臓では、ペースメーカーの機能を担っていることは良く知られている。下等脊椎動物の網膜では、 $I_h$  は持続的な光刺激に対して杆体視細胞の膜電位を暗時の電位方向に戻す機能があることが知られている。以前、我々の実験において、ヒト杆体にも他の種と同様に、 $I_h$  が存在することを報告した。

本研究では、ヒト杆体の  $I_h$  の振幅がドーパミンにより減少することを見出した。ヒト杆体の  $I_h$  は、ホールセルパッチクランプ法により記録した。膜電位固定実験では、20 $\mu$ M ドーパミンは、保持電位 -60mV より過分極パルス (-100 mV) により生じた  $I_h$  の振幅を減少させた。D2 アゴニストの quinpirole も同様に  $I_h$  を減少させたが、D1 アゴニスト SKF-38393 は無効だった。ドーパミンによる  $I_h$  の振幅減少は、D2 アンタゴニストである sulpiride によって阻害された。

膜電流固定実験において、標準リングル液中では過分極性のパルス電流の注入により、膜電位が徐々に減衰した。ドーパミン投与により、膜電位の減衰は減少した。また、Quinpirole でも減衰は減少したが、SKF-38393 は無効だった。

このことから、ドーパミンは D2 レセプターを介して、ヒト杆体視細胞の膜電位応答の削れを抑制することが示唆される。すなわち、ドーパミンは、光刺激に対する回復過程を遅くする機能があるものと推定される。

#### P-18. スナネズミ網膜神経節細胞におけるヒスタミンの影響

大熊真人, 今田英己, 宮地栄一 (藤田保健衛生大学医学部生理学 II)

網膜の細胞にはヒスタミン受容体(HR)が存在する。我々



はスナネズミ幼若期の網膜神経節細胞 (RGC) においてヒスタミン H1, H2, H3 受容体が発現し, 成体では H1 受容体のみが存在することを明らかにした. 網膜における HR の機能は, マカクザルの ON 型網膜双極細胞では電位依存性カリウム電流を増幅するという報告があるが, RGC では明らかではない. そこで我々は RGC におけるヒスタミンの機能について生理学的な研究を行った. まず, カルシウムイメージング法によりスナネズミ網膜細胞の HR の活性を調べたところ, ヒスタミンの灌流投与に応じて細胞内カルシウム濃度を上昇させる細胞が確認できた. 次に, スライスしたスナネズミ網膜の神経節細胞層で電位固定条件でのホールセルパッチクランプ測定を行ったところ, いくつ

かの細胞でヒスタミンによる外向き電流の振幅増加が見られた. さらに別の RGC ではヒスタミン存在下で内向き電流の振幅増加が見られた. 外向き電流の増加は膜電位の過分極側への修飾, 内向き電流の振幅増加は脱分極側への修飾の可能性を示す. 細胞による影響の違いは RGC のタイプによる可能性が考えられるが, これらの結果からヒスタミンによる膜電位の修飾が示唆された. また我々は, ヒスタミン合成酵素であるヒスタジジン脱炭酸酵素 (HDC) と HR との二重染色により, HDC と HR が共に RGC に発現することを明らかにした. 以上の結果から, ヒスタミンは視覚情報の修飾に重要な物質であると予想している.