

第 103 回近畿生理学談話会

日 時：平成 22 年 10 月 2 日（土）9：00～18：00

場 所：大阪大学銀杏会館

当 番：大阪大学大学院医学系研究科統合生理学教室 岡村康司

M1-1. 膜電位依存性ホスファターゼ Ci-VSP の電位依存的な酵素活性の計測とモデリング

○坂田宗平, 岡村康司（大阪大学大学院医学系研究科統合生理学）

近年、我々が発見した膜電位依存性のホスファターゼ Ci-VSP は、N 末端側に電位依存性イオンチャネルにおいて広く保存されている電位センサーと似た膜貫通領域を持ち、その C 末端側に細胞質ドメインを持つ。細胞質ドメインはイノシトールリン脂質を脱リン酸化する活性を持っており、この活性は N 末端側の電位センサーの動きによって制御されていると考えられている。我々は *Xenopus* の卵母細胞に PI (4, 5) P₂ 依存性の活性を持つ内向き整流性カリウムチャネルである Kir 2.1 と Ci-VSP を共発現させた系、および PI (4, 5) P₂ を特異的に認識する phospholipase C の δ サブユニットの pleckstrin homology domain (PHD) に GFP を融合させたタンパク質と Ci-VSP を共発現させた系をそれぞれ用いて、高い膜電位における電位依存的な酵素活性を計測した。さらにこれらの測定系に関して数理モデルを構築し、電位依存的な酵素活性を再現した。その結果、酵素活性の電位依存性は電位センサーの電荷移動量の電位依存性と似たパターンを示した。酵素活性は電位センサーと強く共役し、電位センサーの動きに対応した幅広い膜電位範囲で変化すると考えられた。

M1-2. Neuronal Ca²⁺Sensor-1 は幼弱心筋における心機能亢進因子である

○中村（西谷）友重, 若林繁夫（国立循環器病研究センター分子生理学部）

Neuronal Ca²⁺sensor-1 (NCS-1) は主に興奮性細胞に発現する EF-ハンド Ca²⁺センサータンパク質であり、Ca²⁺上昇を感知してシナプス可塑性を制御するなど神経機能に重要な役割を担うことが報告されている。NCS-1 は神経のみならず未成熟期の心臓にも高発現しているが、心臓における役割は不明であった。また幼弱心筋の EC-coupling の全貌も明らかでない。今回、NCS-1 欠損 (KO) マウスを用いて NCS-1 が幼弱心筋における心機能維持に重要な働きを担うことを明らかにした。すなわち、

1) NCS-1 の KO マウスでは、幼弱期にのみ心拍数およ

び筋収縮力が有意に低下していた。2) そのメカニズムとして KO 心筋では CaMKII 依存性シグナルが低下し、筋小胞体 (SR) 内 Ca²⁺量および細胞内 Ca²⁺レベルが減少したためであるとわかった。3) NCS-1 は心筋 IP₃受容体 (IP₃R) と結合して IP₃R 刺激による局所の Ca²⁺リリースを増加させ、これが幼弱心筋における CaMKII 活性化の Ca²⁺ソースになるのではないかと考えられた。

以上の結果は、NCS-1 が心筋においても重要な Ca²⁺シグナル制御因子であり、IP₃R との相互作用を介して構造的にも未発達な SR の機能を亢進させることにより、幼弱時の心機能維持に寄与していることを示している。

M1-3. グルコースによる膵臓 β 細胞の電氣的バースト発火メカニズムの分岐解析

○車 采映¹, E. Santos¹, 中村靖彦², 野間昭典¹ (¹立命館大学生命科学部生命情報学科, ²京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科)

膵臓 β 細胞の電気活動が細胞外液グルコース濃度 ([G]) によって変化するメカニズムを明らかにするため、広範な実験データに基づく数理モデルを開発した。本モデルではイオンチャネルやトランスポーターで構成される膜システムに加え、グルコース代謝、細胞内 Ca²⁺動態が忠実に記述されている。本モデルは実験でよく知られているように、[G] の増加によって静止状態から断続的バースト発火、連続的発火の三つの特異的な様相を呈する。この様相変化を数学的に説明するため、分岐解析を適用した。モデルを構成する 17 個の常微分方程式の解を求めることで、[G] による様相の変化を定常解の分岐として特定することができた。さらに、膜システムの興奮性の様相を定義するため、細胞内物質濃度をすべて固定して分岐解析を行った。断続的なバースト発火は、細胞内物質濃度変化に応じて膜興奮性の様相が時間的に変化し、膜システムが活性・不活性の二つの状態を交互に繰り返すことで説明できた。本研究は、実体に即した複雑 β 細胞モデルに分岐解析法を適用した初めての研究で、将来、ホルモンや薬物の影響を定量化する分析の枠組みを提供するだろう。

M1-4. G-CSF は IFN/LPS 刺激によって誘導されるヒ

ト好中球からの TNF- α の産生を抑制する

○吉田賢司, 加藤隆幸, 北川誠一 (大阪市立大学大学院医学研究科細胞情報学)

G-CSF はヒト好中球に作用して MEK/ERK 依存性に細胞運動 (ランダム運動) を誘導し, 貪食能や活性酸素産生能を増強する。また, G-CSF は LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からのサイトカイン (TNF- α , IL-8) の産生を STAT3 依存性に抑制する。一方, GM-CSF は LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からのサイトカインの産生を増強する。GM-CSF のこの増強作用は G-CSF によって抑制されることが最近明らかになった (Arch. Biochem. Biophys. 495: 144, 2010)。GM-CSF 同様, IFN- α および IFN- γ も LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- α の産生を増強した。G-CSF は IFN- α /LPS または IFN- γ /LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- α の産生を濃度依存性に抑制した。IFN- α または IFN- γ によって誘導される STAT1 および STAT3 のリン酸化は G-CSF の影響を受けなかった。これらの結果は, GM-CSF, IFN- α および IFN- γ は LPS 刺激によって誘導されるヒト好中球からの TNF- α の産生を増加させることによって炎症反応を増強し, 一方, G-CSF は LPS 刺激によって誘導される TNF- α の産生を抑制するばかりでなく, GM-CSF, IFN- α および IFN- γ の増強作用にも拮抗することによって抗炎症作用を示すことを示唆している。すなわち, G-CSF は好中球の活性酸素産生能などを亢進させることによって生体防御機構を増強すると同時に, TNF- α の産生を抑制することによって組織傷害の抑制と傷害組織の修復促進に寄与していると考えられる。

M1-5. リンパ球抗原受容体刺激で誘発される細胞内 Ca^{2+} 増加に対するミトコンドリア NCX の役割

○金 鳳柱¹, 竹内綾子², 古賀織絵¹, 疋田正喜¹, 松岡達¹ (¹京都大学医学研究科次世代免疫制御を目指す創薬医学融合拠点, ²京都大学医学研究科細胞機能制御学)

B リンパ球の抗原レセプター (BCR) 刺激で誘発される細胞質 Ca^{2+} (Ca^{2+}_c) 増加に対するミトコンドリア NCX (NCXm) の役割を明らかにする目的で, ミトコンドリア NCX 遺伝子 (NCLX) をノックアウトした DT40 B 細胞 (NCLX^{-/-}) を作成した。NCLX^{+/-}細胞では, NCXm 発現が減少し, ミトコンドリアの NCX 活性 (細胞質 Na^+ 依存性 Ca^{2+} 排出) が著明に減少した。抗 IgM 抗体による BCR 刺激に対して, NCLX^{+/-}細胞では約 13% の細胞でわずかに Ca^{2+}_c が上昇したのみであった (野生型では約 96% の細胞が反応)。NCLX^{+/-}細胞では, 小胞体 Ca ポンプを介する小胞体 Ca^{2+} uptake が低下し, その結果, 小胞体 Ca^{2+} 含量が著

明に減少していた。また, 小胞体 Ca^{2+} リークも増加していた。これらの結果から, NCXm は小胞体の Ca^{2+} uptake に寄与することで小胞体 Ca^{2+} 含量を調節し, BCR 刺激後の Ca^{2+}_c 応答を調節することが明らかになった。

M2-1. G 蛋白質制御内向き整流性カリウムチャネルは脱抑制によって活性化する

○稲野辺厚¹, 中川敦史², 倉智嘉久¹ (¹大阪大学大学院医学系研究科薬理学講座, ²蛋白質研究所)

内向き整流性カリウム (Kir) チャネルはリン脂質 PIP₂ によって活性化されるが, G 蛋白質制御 Kir (K_G) チャネルの活性化には, PIP₂に加えて, G 蛋白質 Br サブユニット (G β R) や Na^+ を必要とする。この K_G チャネルに特徴的な活性化機構を明らかにするために, 我々は Na^+ 非存在下で作製した K_G チャネル分子 Kir 3.2 の細胞質領域の結晶構造を明らかにし, Na^+ 存在下の結晶構造と比較した。その結果, Na^+ 非存在下の結晶構造中に N 末端と CD ループ間のイオン結合が特徴的に存在することを見出した。変異体の解析から, N 末端の His69 と CD ループの Asp228 間のイオン結合がチャネルの PIP₂ に対する感受性を低下させていることが明らかとなった。His68 と Asp228 は特徴的に K_G チャネルや K_{ATP} チャネルに保存されており, 各アミノ酸はそれぞれ G β R と Na^+ 依存性の K_G チャネルの活性化に重要なアミノ酸として同定されている。さらに, 2 つの領域は原核生物 Kir チャネル KirBac 3.1 で gate の際に動く領域として報告されている。そのため, 今回見出されたイオン結合は K_G チャネルの活性化を抑制する分子内機構であり, 活性化因子の作用点であることが推定される。

M2-2. 胃癌細胞株 MKN28/MKN45 における NHE1 阻害剤による増殖抑制効果

○細木誠之, 太田麻利子, 中島謙一, 宮崎裕明, 芦原英司, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学)

癌細胞では, 糖やアミノ酸代謝亢進により, 正常細胞よりも多くの酸 (H^+) を産出しているが, 腫瘍細胞の細胞内 pH (pH_c) は, 正常細胞 pH_c に比べむしろ高い状態にある。このことから, 癌細胞においては, H^+ 輸送体機能亢進により, 大量の H^+ が細胞質から除去されていることが示唆される。我々は, 分化度・増殖速度の異なる胃癌細胞株 (MKN28, MKN45) を用い, より低分化の腺癌である MKN45 において, H^+ 輸送体 NHE1 (Na^+ / H^+ exchanger) の mRNA 発現が亢進し, また NHE1 阻害剤にて増殖がより強く抑制されることを報告した。今回は, NHE1 阻害剤による癌細胞増殖抑制のメカニズムを明らかにするために,

NHE1 阻害剤の細胞周期におよぼす影響を調べた。いずれの細胞においても NHE1 阻害剤は G₀/G₁ 遅延をもたらした。さらに、NHE1 阻害剤投与により、より高分化度の MKN28 においては、pHc は変化せず、p53 非依存的 p21 発現増大による G₀/G₁ 遅延をもたらした。一方 MKN45 においては、pHc は低下し、p53 依存的 p21 発現増大による G₀/G₁ 遅延をもたらすことが明らかとなった。

M2-3. 胃癌細胞株 MKN-28 における pH 調節機構と細胞内 Cl⁻ 調節機構

○細木誠之, 太田麻利子, 中島謙一, 宮崎裕明, 芦原英司, 新里直美, 丸中良典 (京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学)

高分化度の胃癌細胞株である MKN-28 において、NHE1 (Na⁺/H⁺ exchanger) 阻害剤投与により、細胞内 pH (pHc) は変化せず、p53 非依存的 p21 発現増大による G₀/G₁ 遅延を介して、増殖抑制がもたらされることを明らかにした。本研究において、NHE1 阻害剤投与にもかかわらず pHc が維持される機構と pHc 非依存的に増殖抑制が引き起こされる機構解明を行なった。① pHc 維持機構：NHE1 阻害下において、pHc を維持すべく NHE1 以外の anion exchanger (AE) や Na⁺/HCO₃⁻ 輸送体 (NBC) などの代償機構が働いている可能性を検証するために、RT-PCR により両輸送体の存在を確認したうえで、AE 阻害剤・NHE1 阻害剤の併用投与を行ったが、pHc の低下は認められず、NHE1 阻害下における pHc 維持の代償機構には NBC の関与が示唆された。②細胞内 pH (pHc)・p53 非依存的 p21 調節機構：我々が既に報告した同細胞株における細胞内 Cl⁻ 濃度 ([Cl⁻]_i) 低下誘因性 MAPK 活性化依存的 p21 発現亢進と同様のシグナル経路が、NHE1 阻害剤投与によっても活性化される可能性が示唆された。これらのことより、NHE1 阻害剤投与が、NBC および Cl⁻/HCO₃⁻ 透過性チャネル依存的に [Cl⁻]_i を低下させ、上記の経路による p21 発現を亢進させた可能性が示唆された。

M2-4. 防腐剤及びアルコール類は TRPV1 及び TRPA1 を介して皮膚上で痛みを引き起こす

○藤田郁尚¹, 岩下静香¹, 吉川季代美¹, 仲原 聡¹, 辻野義雄¹, 小松朋子², 内田邦敏², 富永真琴² (¹株式会社マンダム, ²自然科学研究機構)

防腐剤やアルコール類は、その機能及びその毒性の低さから、医薬品や化粧品で広く応用されている。しかしながら、それらは皮膚上でまれに感覚刺激を引き起こす。最近、感覚神経に存在する TRP (Transient receptor potential) チャネルが刺激物質の感知に重要な役割を担っていること

が明らかになってきた。本研究では、防腐剤及びアルコール類と皮膚上での感覚刺激との関係の解明を、TRP チャネルを強制発現させた細胞による電気生理学的な手法と、敏感なヒトの被験者による感覚刺激測定の一つの手法を用いて試みた。我々はパラベン類がヒト TRPA1 をアルキル鎖長依存的に活性化させ、また、ヒトでは感覚刺激を引き起こすことを明らかにした。一方で、高濃度のアルコール類によってヒト TRPV1 及び A1 が活性化されることも明らかになった。さらに、これらサンプルの起こす感覚刺激強度と TRP チャネルに対する活性の強さは類似の傾向が示唆された。これらの結果より、TRP チャネルは皮膚上での化学物質の検知に重要であることが示された。

M2-5. カプサイシン投与により島皮質において誘発される network oscillation

○佐藤 元, 豊田博紀, 齋藤 充, 姜 英男 (大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学)

ラット島皮質には、吻尾方向に、味覚・内臓感覚・心血管系の化学受容及び圧受容に関与するニューロン群が分布し、カプサイシン (Cap) 受容体 TRPV1 が発現している。香辛料を摂取すると、辛味の認知とともに発汗等の自律神経応答が生じるが、この過程に島皮質に発現する TRPV1 が関与する可能性がある。

本研究では、膜電位感受性色素 RH414 を負荷したラット島皮質水平断薄切標本を作成し、中大脳動脈 (MCA) 吻側の味覚野第 4 層の電気刺激により誘発される興奮を Cap 投与前後において比較検討した。

Cap 投与前では、味覚野において誘発された興奮は急峻な上昇相と緩徐な減衰相からなる単峰性の時間経過を示し、尾側方向への興奮伝播は顕著ではなかった。Cap 存在下では、味覚野で誘発された興奮は尾側方向へ広く伝播し、その後、島皮質全体に惹き起こされた興奮は θ リズムで oscillation を示した。更に、PKC を活性化する PMA を投与すると、θ リズム活動は γ リズムに重畳して現れた。

こうした所見は、島皮質の TRPV1 の活性化により広範な network oscillation が生じ、味覚野及び自律神経領野間の機能的相互作用が惹き起こされる可能性を示唆している。

I-1. 三叉神経中脳路核ニューロンにおいてグルタミン酸作動性入力を無効化するイオン機構

○川寄康大, 齋藤 充, 佐藤 元, 豊田博紀, 姜 英男 (大阪大学大学院歯学研究科高次脳口腔機能学)

三叉神経中脳路核ニューロン (MTNn) は、閉口筋筋紡錘等を支配する一次感覚ニューロン (PSN) であるが、同時

に、咀嚼運動中枢パタン生成器の出力を運動ニューロンへ中継する介在ニューロン (IN) でもある。MTNn は、持続的脱分極状態で IN、持続的過分極状態で PSN という二つの機能モードをとり得ることが報告されている。本研究では、MTNn が PSN モードをとる時に、グルタミン酸 (Glu) 作動性シナプス入力が無効化されるか否かを調べた。

脳幹薄切標本上の MTNn に対し、Glu 或いは AMPA 溶液をバフ投与し、AMPA 受容体電流 (I_{AMPA}) を記録した。過分極状態では I_h 電流 (I_h) が活性化されていることから、その遮断薬 Cs^+ 或いは増強薬 8-Br-cAMP の存在下で I_{AMPA} がどの様に修飾されるかを解析した。

膜を過分極させ I_h を活性化すると I_{AMPA} が減弱した。また 8-Br-cAMP により I_h を増強すると I_{AMPA} が減弱し、逆に Cs^+ により増強された。以上のことから、MTNn は膜の持続的な過分極、或いは、cAMP 産生を促す代謝調節型シナプス入力の働きにより I_h が活性化されることで I_{AMPA} が減弱し PSN モードを維持することが示唆された。

1-2. 音圧依存的抑制に関わるトリ上オリブ核ニューロンの特性

○西野恵里, 大森治紀 (京都大学医学部神経生物学)

両耳間時間差 (ITD) は、水平方向の音源定位において重要な手がかりであり、特に低周波数音で有用である。鳥類で ITD を最初に検出する層状核 (NL) では、GABA 抑制性入力による ITD 検出精度の向上が知られている。我々は以前の研究で、上オリブ核 (SON) からの GABA 抑制性入力が低周波数領域における ITD 検出精度を音圧依存的に向上させることを、ニワトリ NL の *in vivo* 単一細胞記録とシミュレーションより明らかにした。

今回、我々は *in vivo* で NL にトレーサーを注入したニワトリの脳幹切片標本を用いたホールセルパッチクランプ法により、逆行性に標識された SON ニューロンの電気生理学的性質を調べた。SON ニューロンは高い入力抵抗を持ち、発火頻度は刺激強度に応じて増大した。また、従来知られていたグルタミン酸、GABA だけでなく、グリシン作動性の入力を多く受けた。NL などの聴覚神経核は GABA やグリシンに脱分極応答を示すことが知られている。しかし、SON では Cl^- のコンダクタンスが非常に大きいにも関わらず、グルタミン酸受容体阻害条件下では細胞外記録で活動電位が見られないことから、 Cl^- の平衡電位は静止膜電位付近であり、抑制性であることが示唆された。

1-3. 音の終了時に発火するマウス下丘ニューロンの発火特性および発火機構

○笠井昌俊, 小野宗範, 大森治紀 (京都大学医学部神経

生物学)

下丘は聴覚系の皮質下神経核の中でも最大の構造をもつ。ここでは、脳幹の神経核で抽出された種々の聴覚情報が最初に統合される。さらに聴覚以外の感覚入力を受けることも知られている。そのため、下丘の神経細胞活動パターンは極めて複雑である。今回我々は、音の長さを表現するのに役立つと考えられる、オフセット細胞に焦点を当てた。オフセット細胞は、音刺激の終了後に活動電位を発生し、音の終わりをコードすると考えられる。Single unit 記録を行い、得られた PSTH パタンで 4 種に分類したグループ間で、聴覚受容野、音刺激時間感受性、細胞の形態および位置、を比較したが、相互に明らかな相関は見られなかった。さらにこれらのオフセット細胞が、どのような入力を受けて音刺激の終了後に発火するかを調べるために、*in vivo* whole cell 記録をおこなった。オフセット細胞の多く (9/11) は、音の終了時に興奮性のシナプス入力を受けて発火した。また、少数 (2/11) ではあるが、音刺激中に持続的な抑制性の入力をうけ過分極し、刺激終了時にリバウンド発火するオフセット細胞が存在した。

1-4. HCN チャネルはマウス嗅細胞における自発発火の形成に寄与する

○中島則行, 石井孝広, 大森治紀 (京都大学医学部生理学教室)

マウス嗅細胞では自発発火は、嗅球への軸索投射やシナプス形成を支配すると考えられている。視床神経や心臓ペースメーカー細胞で自発発火に関わる HCN チャネルが、嗅細胞にも発現している。

HCN チャネル阻害薬 (ZD7288, Zatebradine, Cs^+) 投与で嗅細胞の自発発火は投与濃度・時間依存的に減少した。ノルアドレナリン、アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性化薬 (Forskolin)、ホスホジエステラーゼ 4 (PDE4) 阻害薬 (Rolipram) 投与により自発発火は増加し、AC 阻害薬 (SQ22536) により自発発火は減少した。HCN 活性化に関わるイノシトールリン脂質 (PIP2, PIP3) の合成阻害薬 (Wortmannin, LY294002) 投与で自発発火は減少するが、PLC 阻害薬 (U73122) 投与では有意な変化はなかった。パッチ電極内 PIP2 は、H 電流のゲート特性を +18mV 脱分極シフトさせた。免疫組織学的には、HCN2 と HCN4 が嗅細胞に強く発現し、アドレナリン β_2 受容体は嗅上皮、軸索に広く分布していた。

嗅細胞の HCN チャネルは、PIP2, PIP3 による定常的な活性化制御のもと、交感神経刺激で増加した cAMP がさらに H 電流を活性化し、細胞の興奮性をコントロールしている事が示唆された。

1-5. マウス一次視覚野の受容野構造地図の可視化：2光子カルシウムイメージングを用いた逆相関法

○森 理也¹、池添貢司¹、古高潤一¹、喜多村和郎²、田村 弘¹、藤田一郎¹ (大阪大学大学院生命機能研究科、²東京大学医学系研究科)

外界の視覚情報は網膜で受容された後、網膜上での位置関係を保ったまま一次視覚野 (V1) に送られる。またその他にも V1 では細胞のいくつかの応答特性と空間配置との間に構造がある事が知られている(機能構造)。これまで機能構造は単一神経細胞計測法や内因性光学信号計測などの空間分解能が低い手法で調べられてきたため、神経細胞レベルでの機能構造を正確に知ることは出来なかった。

本研究では *in vivo* 2光子カルシウムイメージング方と逆相関法を組み合わせることによってマウス V1 の様々な機能構造を同時に可視化することを試みた。麻酔下のマウスにノイズ刺激を提示し、線形走査法による高速カルシウムイメージングを行った。得られたシグナルから発火頻度の推定を行い、その後逆相関法により計測領域内の全ての神経細胞の受容野構造を決定した。

得られた受容野構造から受容野の中心位置、受容野の大きさ、受容野の傾き、空間周波数、位相、位相選択性を求め、これらの性質の機能構造の可視化に成功した。受容野の中心位置は脳表上でなめらかな変化を示し、脳表における 250 μ m 以内の範囲でも視野再現地図があることを確認した。

B1-1. 両耳間時差検出に対する2つの抑制機構による相補的調節

○山田 玲、奥田裕子、久場博司、西野恵里、石井孝広、大森治紀 (京都大学医学部神経生物学)

動物は両耳間時差 (ITD) を手がかりに音源定位を行う。ITD は鳥類では層状核 (NL) 神経細胞で検出される。NL における ITD 検出精度は、上オリブ核 (SON) からの音圧を反映した持続的な抑制入力により調節され、音圧依存的に ITD 反応特性のコントラストが増大すると考えられている。今回我々は低周波数領域の NL 細胞において、蝸牛神経核からの EPSC に同期して 1-2ms の遅延で時間経過の早い IPSC が生じる事を見いだした。この IPSC は SON からの投射線維を切断しても残り、caged-グルタミン酸を用いた局所刺激でも観察されることから、NL 近傍に存在する GABA 細胞を介して発生すると考えられる。つまり低周波数領域の NL には特性の異なる 2つの抑制入力 が並列に存在する。これらの抑制入力による ITD 検出調節作用をシミュレーションにより検討した。音圧依存性の持続的抑制は強い音圧での ITD 検出を改善するのに対し、興奮入力に

同期した位相応答性の高い抑制は弱い音圧での ITD 検出を改善した。従って低周波数領域の NL では、2つの抑制回路が相補的に機能する事で、広い範囲の音圧に対して安定した高い精度で ITD 検出を実現している可能性が示唆された。

B1-2. 皮質内電気刺激によるマウス視覚野神経活動の *in vivo* 光学計測

○岡崎 祐香¹、T. Fehervari¹、澤井 元²、八木哲也¹ (大阪大学大学院工学研究科電気電子情報工学専攻、²大阪大学大学院医学研究科統合生理学講座)

視覚野神経回路の形成や機能における分子機序を明らかにするには、遺伝子改変マウスを用いた研究が有用である。そこで本研究では、まず野生型マウスを用いて一次視覚野 (V1) へ電気刺激を加えた際の神経活動を、膜電位感受性蛍光色素 (VSD) を用いた *in vivo* 光学計測にて観測した。麻酔下の成熟マウスの右視覚野を露出し VSD にて染色した後に、V1 内に電気刺激を加えた。その際の神経活動に伴う蛍光量変化を高時空間分解能の CMOS カメラにて撮像した。その結果、電気刺激直後にニューロン集団の興奮性の応答が生じ、急激に減衰した後に、数百 ms 間の遅い抑制性の応答が観測された。この計測精度は、電気生理で記録された神経活動の時間変化と遜色無かった。興奮性の応答は V1 や二次視覚野考えられている latero-medial area 及び他の高次視覚領と考えられている antero-medial area などの部位にスポット状に出現した。それに対して遅い抑制性の応答は、視覚野全体を覆うように広がる事が観測された。本研究において、マウス視覚野における神経活動の伝播動態を高い時空間分解能で観測できることが示された。

B1-3. LGN ニューロンにおける明るさを表現する神経活動

○原 真一郎¹、七五三木 聡²、木村晃大²、石川理子¹、佐藤宏道^{1,2} (大阪大学大学院生命機能研究科、²大阪大学大学院医学系研究科)

面の明るさ (brightness) の知覚は、観察している部分の輝度 (luminance) だけではなく、周囲の輝度に強い影響を受ける。このような広域輝度情報に基づく明るさ知覚の神経メカニズムを明らかにするために、本研究では、麻酔・非動化したネコの視床外側膝状体 (LGN) から、細胞外単一ユニット記録を行なった。受容野とその周囲を円形状に大きく覆う中心領域 (中心刺激、直径 = 20°) と、中心刺激の外側領域 (背景刺激、30° × 40°) を、一様な輝度の面刺激として、様々な輝度の組み合わせで 500 ミリ秒間呈示した時の LGN ニューロン応答の時間特性を検討した。その結

果、中心刺激は一過性応答とそれに続く遅延応答を引き起こし、この遅延応答（反応潜時 50-120 ミリ秒）が、中心刺激と背景刺激の輝度差（相対的輝度）と相関することがわかった。この応答特性は GABA_A 受容体拮抗薬存在下でも影響を受けなかった。以上より、LGN ニューロンの遅延応答は、視対象の面領域における主観的な明るさの脳内表現に関与し、それは主に LGN ニューロンへの興奮性入力によって形成される可能性が示唆された。

B1-4. ネコ外側膝状体ニューロンの受容野時空間構造と方位選択性

○末松尚史¹、内藤智之²、佐藤宏道²（¹大阪大学基礎工学部、²大阪大学大学院医学系研究科）

高等哺乳類の視覚系において刺激方位に対する選択性は一次視覚野に至って初めて観察されると考えられているが、ネコの外側膝状体（LGN）ニューロンは高空間周波数の刺激に対して方位選択性を示すと報告した先行研究もある。本研究では LGN ニューロンの受容野の線形時空間構造で方位選択性が説明出来るかを調べた。麻酔・非動化したネコの LGN より単一ニューロン活動を記録し、その方位チューニングを様々な空間周波数のドリフトグレーティング刺激を用いて計測した。次にノイズ刺激を用いた逆相関法によりニューロンの受容野の時空間構造を得た。その受容野構造からチューニングを予測し、実測のものと比較した。その結果半数以上（20/32 個）の LGN ニューロンの受容野は最適方位と同じ方位に伸びた楕円形であった。一方でいくつかのニューロンでは予測のチューニングが実測のチューニングよりも明らかに鈍く、最適方位が異なっているものもあった。これらの結果は、楕円形線形受容野構造は LGN の方位チューニングの主要なメカニズムであるがその楕円の縦横比は実測の方位チューニング全体の説明には不十分であり、受容野周囲を含む非線形なメカニズムも LGN の方位チューニングの生成に寄与していることを示唆している。

B1-5. ネコ外側膝状体の空間周波数選択性の形成に果たす GABA 抑制の役割

○木村晃大¹、七五三木 聡^{1,2}、原 真一郎²、岡本正博²、佐藤宏道^{1,2}（¹大阪大学大学院医学系研究科、²大阪大学大学院生命機能研究科）

網膜から大脳皮質視覚野に至る初期視覚経路の各段階でニューロンは視覚刺激の空間周波数（SF）に対し選択性を示す。反応の SF 選択性を調べると網膜は特定の周波数以下で反応する lowpass タイプ、一次視覚野は中間帯域の周波数にチューンした bandpass タイプを示す。SF 選択性が

各段階で変化していくメカニズムは明らかにされていない。今回、麻酔・非動化したネコを使い、外側膝状体（LGNd）ニューロンの SF 選択性形成に果たす視床内抑制の役割を調べた。様々な SF のグレーティング刺激をドリフト呈示した時の単一ニューロン応答を細胞外記録し、GABA_A 受容体拮抗薬（ビククリン）、GABA_B 受容体拮抗薬（CGP52432）をイオン泳動投与し効果を調べた。LGNd ニューロンの SF 反応曲線は GABA_A 受容体を介した視床内抑制をブロックすると bandpass タイプから lowpass タイプに変わり、またそれは高い刺激コントラスト条件で顕著だった。GABA_B 受容体をブロックすると、視覚応答性は上昇したが SF 選択性は変化しなかった。LGNd 内の SF 選択性の形成において 2 種類の GABA 抑制はそれぞれ異なる役割を果たしていると考えられる。

B1-6. ネコ視床網様核と外側膝状体間の活動相互相関解析法による神経回路の解明

○尾崎弘展¹、内藤智之¹、相馬祥吾²、佐藤宏道^{1,2}（¹大阪大学大学院医学系研究科、²大阪大学大学院生命機能研究科）

視床網様核は抑制性細胞からなる核構造で、大脳皮質一次感覚野に投射する視床中継細胞の軸索側枝および皮質からのフィードバック投射を興奮性入力として受け取り、中継細胞に対して抑制性入力を与える。つまり、視床網様核は中継細胞に対していわゆる反回性抑制回路を形成している。しかし、この反回性抑制の機能については十分な検討がなされていないため、この反回性抑制回路が「自原抑制」として働くのか「側方抑制」として働くのか、という結論は出ていない。

そこで我々は、麻酔非動化したネコ視床網様核および外側膝状体から同時に単一細胞外記録を行い、スパイク活動相互相関解析により機能的結合関係を明らかにすることで、この反回性回路の働きを調べた。その結果、それぞれの受容野が互いに重なっている 15 ペアの機能的結合関係をもつ細胞同士の記録に成功した。これら細胞ペアの受容野特徴を詳細に分析したところ、空間周波数選択性・時間周波数選択性といった刺激特徴選択性のよく似たもの同士は興奮性結合しか持たず、刺激特徴選択性の異なるもの同士が抑制性結合を持つことが分かった。このことから、視床網様核を介する反回抑制は外側膝状体に対して「側方抑制」として働いていると考えられる。

B2-1. マウス一次視覚野における興奮性と抑制性信号の競合特性

○島田義規¹、志岐卓也¹、小山内 実²、八木哲也¹

(¹大阪大学大学院工学研究科, ²東北大学大学院医学系研究科)

一次視覚野の機能的モジュールの形成には、興奮性と抑制性信号の競合特性が深く関わる。両信号の競合特性を時空間的に捉えるために、マウス一次視覚野 (V1) を含む冠状断スライス標本に Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Oregon Green 488 BAPTA-1 AM を負荷し、電流刺激に対する Ca^{2+} 濃度変化を、冷却 CCD カメラにより約 3ms のフレーム速度で撮像した。V1 の IV 層への電流刺激に対し、興奮性応答が刺激位置を中心に 2/3 層および 5 層へと広がった。応答の広がる様子を、フレーム間差分によって解析したところ、4 層から 2/3 層の限局した範囲へ興奮性応答が伝達していることが分かった。次に、抑制性信号伝達経路を GABA-A 受容体阻害剤である bicuculline で阻害したところ、電気刺激によって惹起された興奮性応答が、刺激から観測領域全体、特に II/III 層の水平方向に広がることが観察された。フレーム間差分を見ると、興奮性応答は刺激位置で増加した後、II/III 層へと伝達し、さらに水平方向に伝播していることがわかった。以上により 4 層の興奮性信号は、興奮性シナプスを介し主として 2/3 層へ伝達され、さらに複数シナプスを介し側方へと広く伝播しようとするが、GABA-A シナプスを介したフィードフォワード抑制が時間遅れでその伝播を阻止し、興奮範囲を限局させていることが分かった。

B2-2. ネコ一次視覚野における受容野周囲抑制選択的な興奮性ネットワーク

○内藤智之、佐藤宏道 (大阪大学大学院医学系研究科)

一次視覚野ニューロンの受容野内刺激に対する応答は受容野周囲に提示された刺激によって主に抑制性の修飾を受ける (受容野周囲抑制)。本研究では、麻酔非動化したネコ一次視覚野 4 層-2/3 層間及び 2/3 層-2/3 層間ニューロンペア応答を 2 本の金属電極を用いて同時に細胞外記録し、各ニューロンの刺激方位チューニングと刺激サイズチューニングを計測した。更にスパイク列の相互相関を計算し、ニューロンペアの機能的結合の有無を調べた。4 層-2/3 層ペアにおいては主に 4 層から 2/3 層への直接投射が観察された。有意な直接結合を有するペアは、結合のないペアと比較して最適方位と受容野周囲抑制の程度が有意に類似していた。2/3 層-2/3 層ペアにおいては、多くの場合共通入力を反映する相互相関が観察されたが、機能的結合の有無とニューロンペアの方位選択性の類似度には関連性は見られなかった。一方、有意な結合を示したニューロンペアは結合のないペアと比較して受容野周囲抑制の程度が類似していた。V1 内ネットワークにおいて 4 層から 2/3 層への興

奮性投射および 2/3 層内の興奮性結合は受容野周囲抑制の程度に選択的であり、受容野周囲抑制という観点からも機能的クラスターを構成していると考えられる。

B2-3. サル一次視覚野におけるムスカリン性アセチルコリン受容体を介した光応答強度の増大

○相馬祥吾、七五三木 聡、佐藤宏道 (大阪大学大学院生命機能研究科)

サルの一次視覚野 (V1) は機能的に分化した 6 層構造をなし、ニコチン性 ACh 受容体が入力層である 4 層特異的に、ムスカリン性 ACh 受容体 (mAChR) が全層に発現しており (Disney et al. 2006, 2007)、ACh は V1 での視覚情報処理において何らかの役割を担っている。そこで、我々は生理学的・薬理学的手法を組み合わせる麻酔非動化したサルの V1 細胞の細胞外記録を行い、局所投与した ACh やその受容体阻害剤が神経細胞の入出力の関係を表すコントラスト-反応曲線に対してどのような効果を持つか調べた。その結果、ACh は多くの V1 細胞で促進性効果 (42/70)、一部で抑制性効果 (5/70) を齎した。この内、促進性効果は全層で観察されたが、抑制性効果は 4B 層及び 4C 層に限局していた。また、促進性効果を示した細胞に関してコントラスト-反応曲線を作成したところ、ACh はコントラストの閾値を変化させずに、コントラストの増大に伴って発火応答を増幅した (反応ゲイン調節)。この効果は mAChR 阻害剤であるアトロピンの投与で完全に、または部分的に拮抗された。以上より、ACh は V1 の全層で少なくとも mAChR を介して反応ゲインの調節を行っていると考えられる。

B2-4. サル V2 野細胞の色と運動方向の組み合わせに対する選択的応答

○荒殿航輔、田村 弘 (大阪大学大学院生命機能研究科)

これまでの解剖学的、神経生理学的、そして心理物理学的研究の多くは、色、形、運動方向、両眼視差などの視覚属性の情報が、並列で独立な経路によって処理されていることを示してきた。一方、日常生活において、我々は統一した視覚経験を多くの場合維持している。例えば、視野に二つの視覚対象、右に動く赤い物体と上に動く青い物体が存在するときに、色と運動方向の組み合わせを取り違えることはない。このような統一された視覚経験を維持するためには、独立・並列に処理されるそれぞれの視覚属性の情報が、何らかの方法で統一される必要がある。このような問題は「結びつけ問題」と呼ばれている。この問題の一つの解決方法は、単一の神経細胞による異なる視覚属性の情

報の統合である。しかし、実際に「結びつけ問題」の解決に必須である、特定の視覚属性の組み合わせに対して選択的な応答を示す神経細胞は報告されていない。そこで本研究では、特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的な応答を示す神経細胞が存在するのかを検討した。実験では、12または29の色と12の運動方向を組み合わせた視覚刺激を呈示し、麻酔不動化したサルのV2から、多点電極を用いて、多細胞同時計測を行った。その結果、特定の色と運動方向の組み合わせに対して選択的に応答する細胞が存在していた。

B2-5. サル頭頂間溝皮質の異なる細胞クラスの視覚グルーピング課題への寄与

○横井 功^{1,2}, 小松英彦² (1和歌山県立医大生理学第一講座, 2自然科学研究機構生理学研究所)

視覚グルーピングとは視野上に存在する離散的要素をつなぎ合わせ単一の視覚対象としてとらえることである。皮質の細胞には抑制性の介在細胞と興奮性の錐体細胞の2つの機能的クラスが存在するが、異なるタイプのニューロンがどのように視覚グルーピングに関与しているかは明らかでない。グルーピングを必要とする検出課題設定し、課題遂行中のサル頭頂間溝皮質の外側壁(L-IPS)から細胞外電気生理記録を行った。視覚刺激は十字に配置した5つの白または黒の正方形ドットによって構成される。サルは同じコントラストのドットが水平または垂直に並んだパターンをターゲット刺激として検出する。記録したニューロンをスパイク波形に基づいて二つのクラスに分類した。狭いスパイク幅の細胞(Nr)は広いスパイク幅の細胞(Br)よりも高い発火頻度を示した。錐体細胞に対応すると考えられるBrはターゲット刺激に含まれる視覚特徴に選択的な反応を示し、その選択性は選択的注意を向けることによって強められた。一方、介在細胞に対応すると考えられるNrはそのような選択性または注意による選択性の増強を示さなかった。L-IPSの異なる細胞クラスは視覚グルーピングに異なる寄与をしていることが示唆された。

B2-6. 同一方向へ動く二つの縞刺激により誘発されるサル追従眼球運動

○青木佑紀, 三浦健一郎, 河野憲二(京都大学大学院医学研究科認知行動脳科学)

視覚システムにおいて、大域的な動きの検出は、小さな受容野を通じた局所的な運動情報が統合され実現されている。局所的に検出された動きにはノイズも多く、この局所情報がどのように統合され大域的情報へと変換されるのかは興味深い問題である。

我々は、注視点の上下二つの位置に同一方向へ動く縞刺激を呈示し、それにより誘発される追従眼球運動を観察することで、局所運動情報がどのように統合されるのかを調べた。追従眼球運動とは、外界の大域的な動きに対して短潜時で起こる反射性眼球運動である。

視覚刺激を見ている時のサル3頭の眼球運動を計測した。視覚刺激として、画面横一杯に広がる、高さ4°の正弦波状縞のスリットを以下の2条件で用いた: ① Double grating 条件: 2つの縞刺激を、1つを注視点の上に、他を注視点の下に提示。② Single grating 条件: 1つの縞刺激を注視点の上か下に提示。様々な空間周波数の縞刺激を時間周波数25Hzで動かした。

Double grating 条件で観測された追従眼球運動は、Single grating 条件における反応の線形和から予測されるものと較べて大きかった。この結果は、局所的な運動情報の間に非線形な統合処理過程が存在することを示唆する。

A1-1. Na⁺/H⁺交換体阻害薬経口投与によるイソプロテレノール誘導性肥大型の肥大抑制作用とCa²⁺トランジェントへの影響

○竹下大輔, 柴田宗孝, 服部宇孜, 張 国興, 小畑孝二, 松吉ひろ子, 三澤裕美, 高木 都(奈良県立医科大学生理学第二講座)

我々は、イソプロテレノール(ISO)持続投与によって、心肥大形成とともに筋小胞体のCa²⁺ポンプの機能低下がおこり、その結果として細胞膜のNa⁺/Ca²⁺交換体の活性化が起こることを昨年の本会で報告した。本研究では、ISO誘導肥大型における新規のNa⁺/H⁺交換体-1(NHE-1)選択的阻害薬(BIIB 723)による心肥大形成およびCa²⁺トランジェントへの影響を検討した。ラット頸部に浸透圧ミニポンプを植え込み、ISO(1.2mg/kg/日)または生食(2.4μl/日)を7日間持続投与し、BIIB 723(3.0mg/kg/日)を飲水投与した群を含む4群において、心エコーで心臓の機能的・形態的特徴を調べ、心筋スライスのCa²⁺トランジェント測定を行った。ISO投与群における左室壁の肥厚、心体重比、左室体重比は、BIIB 723投与によって有意に抑制された。Ca²⁺トランジェントもSERCA2aタンパク量の回復に伴い、生食単独群と同等の持続時間を示した。現在、その詳細な機序を検討中である。

A1-2. ラット急性虚血モデルにおけるカルパイン阻害薬の作用—1心拍当たりの総機械エネルギー(PVA)解析から—

○田中みどり^{1,3}, 張 国興¹, 小畑孝二¹, 松吉ひろ子¹, 吉川義朗², 竹下大輔¹, 三澤裕美¹, 谷口繁樹², 高

木 都¹ (1 奈良県立医科大学生理学第二講座, 2 奈良県立医科大学胸部・心臓血管外科学講座, 3 姫路獨協大学)

我々は血液交叉灌流実験系にて, 新しい水溶性カルパイン阻害薬 (SNJ-1945) の冠動脈注入が, 高カリウム心筋保護液による心停止後の再灌流障害から心臓を保護するという結果を報告している. 本研究では臨床により近い条件であるラット生体位心において, SNJ-1945 の腹腔内投与が左冠動脈閉塞・解除による心虚血再灌流時に心筋保護作用を示すのか, さらに我々が見いだした SNJ-1945 の β_1 作用が心筋保護作用にどのような影響を及ぼすかについて左心室収縮期末圧-容積関係と PVA を解析することにより検証する. ラットを麻酔・開胸後, 人工呼吸下に, コンダクタンスおよび圧カテーテルを心尖部より挿入し, 圧-容積ループを記録する. 上行大動脈閉塞により収縮末期圧-容積関係と PVA を求める. 本研究では, 次の 4 群, 1) 無処置群, 2) 虚血-再灌流群, 3) SNJ-1945 + 虚血-再灌流群, 4) β_1 ブロッカー (landiolol) + SNJ-1945 + 虚血-再灌流群で比較検討した結果を報告する.

A1-3. 中枢投与したグレリンは麻酔下ウサギの心臓迷走神経活動を亢進させる

○清水秀二, 秋山 剛, 川田 徹, 神谷厚範, 白井幹康, 杉町 勝 (国立循環器病研究センター研究所)

グレリンが, 交感神経活動を抑制し, 心臓保護作用を発揮することは知られているが, グレリンの心臓迷走神経活動に対する影響はほとんど知られていない.

そこで, 麻酔下ウサギにおいて, 側脳室内投与したグレリンが, 血行動態・心臓自律神経活動にどのような影響を与えるかを, 心臓マイクロダイアリス法を用いて検証した. 洞房結節周囲の右心房にマイクロダイアリス・プローベを植込み, 透析液中のノルエピネフリン・アセチルコリン濃度を高速液体クロマトグラフィーで計測することにより, 心臓自律神経活動の指標とした. グレリン投与前には 270 ± 4 bpm であった心拍数は, グレリン投与後 40 分から徐々に低下し, 60~80 分後に 234 ± 9 bpm ($P < 0.01$) に達し, 120 分後まで低下が維持された. グレリン投与前には 5.5 ± 0.8 nM であったアセチルコリン濃度は, 心拍数低下に合わせて, 40 分後から有意に上昇し, 60~80 分でピークに達し (8.8 ± 1.2 nM, $P < 0.01$), 120 分後まで上昇が維持された. 平均血圧とノルエピネフリン濃度には変化はなかった. 以上より, 中枢投与したグレリンは, 心臓迷走神経活動を亢進させることが示唆された.

A1-4. プロカテロール (β_2 -agonist) によるマウス末梢気道線毛運動の振幅増大と周波数増加

○大黒恵理子, 中張隆司 (大阪医科大学生理学)

肺の宿主防御機構である粘液線毛クリアランスは, 末梢気道で捉えた吸入異物を中枢気道へ輸送している. このシステムにおいて線毛運動は気道ベルトコンベアーのエンジンとも言えるものである. これまで線毛運動の研究は中枢気道を対象として行われ, 末梢気道はほとんど研究がなされてこなかった.

今回, マウス末梢気道線毛細胞を高速度カメラ (500Hz) で観察し, 末梢気道線毛運動に対するプロカテロール (β_2 刺激薬) の効果について検討した.

プロカテロールは濃度依存性に線毛運動周波数 (CBF) を増加させた. 最大刺激では CBF は約 180% に増加した. 同時に, ビデオ画像の解析から, プロカテロールは線毛運動の振幅 (CBA) も増加させていることが明らかとなった. このプロカテロールの効果は, cAMP/PKA シグナルを介したものであった. さらに CBF と CBA の濃度依存性を調べた結果, CBA の濃度依存性が CBF に比較して低濃度側へシフトしていた. 10pM のプロカテロールは CBA のみを増加した.

一方で, 肺のスライス標本を用いて, 末梢気道に負荷したラテックスビーズ (1 μ m 径) の輸送を観察した結果は, 10pM プロカテロールによる CBA の増加がラテックスビーズの輸送を活性化していることが明らかとなった. これらの結果は, 粘液線毛クリアランスの活性化には CBF のみならず, CBA も重要であることが明らかとなった.

A1-5. モルモット胃幽門腺粘液細胞における Ca^{2+} 調節性開口放出のアラキドン酸/PPAR α による増強

○澤辺幸紀¹, 中張隆司², 丸中良典¹ (1 京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学, 2 大阪医科大学生理学)

インドメサシン (IDM, 10 μ M) は, アスピリン (ASA, 10 μ M) と異なり, モルモットの幽門粘膜細胞においてアセチルコリン (ACh, 1 μ M) による Ca 調節性開口放出を増強する. IDM はアラキドン酸 (AA) からのプロスタグランジン G/H (PGG/H) と 15R-HPETE 産生を阻害するが, ASA は PGG/H 産生を阻害するが 15R-HPETE 産生を増強する. このことは, IDM は AA を蓄積させることを示唆している. AA と AACOCF₃ (AA の非代謝性アナログ) は IDM と同様に Ca 調節性開口放出を増強した. これは, AA そのものが Ca 調節性開口放出を増強することを示している. AA は PPAR α の天然リガンドであることから PPAR α の効果について調べた. PPAR α 刺激薬 (1 μ M WY14643) は Ca 調節性開口放出を増強し, PPAR α 阻害剤 (50 μ M MK886) は, AA, IDM, AACOCF₃, WY14643 によって増強された Ca 調節性開口放出を抑制した. ウェスタンブ

ロッキングと免疫組織化学検査において幽門粘膜細胞に PPAR α が認められた。また、MK-886 は ACh とタブシガルジンによる Ca 調節性開口放出を 25-30% 減少させた。このように [Ca²⁺]_i 増加による AA 合成が PPAR α を活性化し、幽門粘膜細胞における Ca 調節性開口放出を増強していることが明らかとなった。

A1-6. 小腸の栄養吸収機能障害におけるクローデインの役割

○田村 淳, 林 久由, 今里光伸, 和田真実, 山崎裕自, 萩原明日香, 渡辺光博, 野田哲生, 鈴木裕一, 月田早智子 (大阪大学大学院医学系研究科分子生体情報学)

多細胞生物は生体が様々な機能を営むための至適環境を持つ複数のコンパートメントに分割されている。これらのコンパートメントは、上皮細胞という機能・形態的に高度に分化した細胞のシートにより取り囲まれる。一方、上皮細胞シートのバリアー機能は主にタイトジャンクション (TJ) のクローデイン (Cldn) により司られると示唆されている。Cldn は TJ の形成に不可欠な膜蛋白質であり、ヒトやマウスでは少なくとも 24 種類のサブタイプからなるファミリーを構成する。Cldn の発現の組み合わせにより、TJ を介した物質のバリアーやイオンの選択的な透過性が制御されると考えられているが、制御機構については不明な点が多い。

今回 Cldn-2, 15 という腸管に特に発現の多い 2 つの Cldn のノックアウトマウスを用いて、腸管のイオンホメオスタシスや栄養吸収などの生体機能における TJ の役割について検討を行った。成長した大人マウスの腸管では、Cldn-15 の欠損による TJ のイオン透過性の低下が、腸管内のイオンホメオスタシスを大きく崩し、結果としてナトリウムイオン依存性のグルコース吸収が障害されることが分かった。TJ を介するイオン輸送が生体内機能制御に重要であることが示されたが、こうした機能の一般性についてさらに解析を進めたい。

A2-1. システム工学的視点による高血圧の病態解明

○佐田悠輔, 清水秀二, 川田 徹, 杉町 勝 (国立循環器病研究センター研究循環動態制御部)

自然発症高血圧ラット (SHR) と正常圧コントロール (WKY) ラットにおいて、動脈圧受容器反射の開ループ静特性を比較した。

麻酔下の SHR (n=7) と WKY (n=6) を用い、両側の頸動脈洞を体循環から分離し、WKY では 60~180mmHg, SHR では 60~220mmHg の範囲の階段状圧入力に対する体血圧と左内臓交感神経活動の応答を記録した。

中枢弓 (入力圧-交感神経活動) はシグモイド状の曲線を示し、SHR では交感神経活動の応答幅は小さく (91 \pm 4% vs. 72 \pm 7%, P<0.05), 傾きも小さかった (0.14 \pm 0.01 vs. 0.07 \pm 0.01mmHg⁻¹, P<0.01)。一方、末梢弓 (交感神経活動-体血圧) は直線近似でき、SHR では傾きが大きく (0.77 \pm 0.12 vs. 1.4 \pm 0.17%/mmHg, P<0.05), 血圧の応答幅も大きかった (71 \pm 5 vs. 102 \pm 4mmHg, P<0.01)。中枢弓と末梢弓から平衡線図を描くと、動作点血圧は SHR で高値を示したが (109 \pm 5 vs. 144 \pm 6mmHg, P<0.01), 圧反射ゲインには有意差がなかった。

SHR では交感神経活動に対する体血圧応答は増大するが、圧反射ゲインは保たれていることが判明した。

A2-2. リングの抗血栓作用とその作用メカニズム

森下麻衣¹, 松尾 理², 岡田清孝², 岡田芳男³, 津田裕子³, ○山本順一郎¹ (¹神戸学院大学栄養学部生理学研究室, ²近畿大学医学部生理学第 2 教室, ³神戸学院大学薬学部)

我々は野菜・果物の品種に注目し、抗血栓作用を持つ品種の探索を行ってきた。今回はリング品種の抗血栓作用および抗血栓作用機序を検討したので報告する。

【材料および方法】

リング品種の搾汁液を作成し、抗凝固剤を含まないラット血液に添加し、ズリ惹起血小板反応性・血栓溶解能測定装置 (Global Thrombosis Test, GTT) を用いて、血小板反応性および血栓溶解能に対する作用を測定した (in vitro)。抗血栓活性を示したリング搾汁液をマウスに経口投与し、He-Ne レーザー惹起頸動脈血栓形成法により抗血栓作用を測定した (in vivo)。次いで、抗血栓作用を示したリング搾汁液を経口投与後、合成プラスミン阻害剤 YO-2 および抗ヒト t-PA, u-PA, PAI-1 IgG を血管内投与し、抗血栓作用を測定した (in vivo)。また、t-PA KO マウスにリング搾汁液を経口投与し、血栓形成を測定した。

【結果および考察】

リング搾汁液は血小板反応性にはほとんど作用しなかったが、血栓溶解能を亢進させた。両者に対する作用により、リング品種はグループに分けられた。リングの抗血栓作用は、血栓溶解能によることが示された。有効成分は加熱耐性であり、この成分は腸管から吸収された後、宿主の t-PA 放出を惹起し、抗血栓作用をあらわすことが示された。

A2-3. 延髄背内側部の低血流は動脈圧を上昇させる

○和気秀文, S.S.S. Gouraud, M.E.R. Bhuiyan, 高岸美和, 向阪 彰, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部第 2 生理)

古くから脳虚血時には交感神経活動の著しい増加とそれに伴う動脈圧の上昇が報告されているがその機序については今もなお不明な点が多い。我々は循環調節中枢の一つである延髄孤束核での低血流が動脈圧上昇に関与しているという仮説を立て、ウレタン麻酔下ラットの尾側小脳脚静脈を閉塞した際の動脈圧応答について調べた。当該静脈の両側閉塞は孤束核を含む延髄背内側部の血流を低下させるとともに、孤束核酸素分圧の低下を引き起こした。全身動脈圧は静脈閉塞後直ちに上昇したが、その反応は圧受容器反射機能による代償作用を除去した際により顕著となった。また、3時間の当該静脈閉塞後に孤束核における heme oxygenase (HO)-1, HO-2 および hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) 遺伝子発現を調べたところ、HO-1 遺伝子のみ有意な発現増加を認めた。以上より、脳虚血時の血圧上昇機序の一つとして、孤束核 HO-1 による O₂ センシング機序が関与している可能性が示唆された。本研究の一部は科学研究費補助金 (21300253) によって行われた。

A2-4. 高血圧症の運動療法が延髄孤束核遺伝子発現に及ぼす影響

○S.S.S. Gouraud, 和気秀文, M.E.R. Bhuiyan, 高岸美和, 向阪 彰, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部第2生理)

運動療法により高血圧症が改善すると言われているがその機序については不明な点が多い。運動療法により交感神経活動量が低下するので、我々は心臓血管中枢の可塑的変化が降圧効果の一因であると考えた。本研究ではこの仮説を検証する第一段階として、継続的運動が孤束核の分子生物学的特性に影響を及ぼすか否かを調べた。高血圧ラットを用い、回転ケージ内で12週間自発性走運動を行わせた群と対照群の2群に分けた。飼育後に孤束核を摘出し、Rat Genome DNA Microarray (Agilent社)により発現の異なる遺伝子をスクリーニングした。その結果、41,000個以上の標的遺伝子のうち、260の遺伝子が運動により孤束核特異的に発現変動していることが明らかとなった。さらにパスイ解析により、神経性リガンド-受容体相互作用に関わる遺伝子群のうち、ヒスタミン H₁ 受容体やセロトニン 1A 受容体などの遺伝子発現に変化を認めた。これらの発現プロファイルが孤束核神経細胞の可塑的変化と、結果として高血圧の改善に関与しているのかどうか今後詳細に検討していく。本研究の一部は科学研究費補助金(21300253)および武田科学振興財団研究助成金によって行われた。

A2-5. Histamine in the nucleus tractus solitarius regulates cardiovascular function in rats.

○MER. Bhuiyan¹, H. Waki¹, S.S. Gouraud¹, M. Takagishi^{1,2}, A. Kohsaka¹, M. Maeda¹ (¹Department of Physiology, Wakayama Medical University, Japan., ²Department of Therapeutic Health Promotion, Kansai University of Health Sciences, Japan.)

Axons of histamine-containing neurones are known to project from the posterior hypothalamus to many areas of the brain, including the nucleus tractus solitarius (NTS), a central brain structure that plays a vital role in regulating the set-point of arterial pressure. However, the functional significance of NTS histamine is still not fully established. In this study, we microinjected either histamine or 2-Pyridylthylamine, histamine receptor H₁ agonist, into the NTS of urethane-anaesthetized Wistar rats to identify the functional roles of NTS histamine on cardiovascular regulation. When histamine and H₁ agonist were bilaterally microinjected into the NTS, mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were significantly increased, whereas microinjection of vehicle (saline) had no significant effect. The maximal responses of MAP and HR changes were dose-dependent. Pretreatment with H₁ receptor antagonist cetirizine into the NTS significantly inhibited the histamine and H₁ agonist induced cardiovascular responses. In addition to the functional examinations, we also immunohistochemically identified that H₁ receptors were dominantly expressed in the NTS neurons. These findings suggest that histamine within the NTS may be important for regulating cardiovascular homeostasis via activation of H₁ receptors expressed in the NTS neurons. The study was financially supported by the JSPS (21300253) and the Takeda Science Foundation.

A2-6. エネルギー代謝リズムが血圧日内リズム制御に与える影響

○向阪 彰, 崔 鶴, 和気秀文, MER. Bhuiyan, S. Gouraud, 前田正信 (和歌山県立医科大学医学部生理学第2講座)

高血圧症において、血圧の日内リズム消失は心血管障害の危険因子である。睡眠・覚醒などの多くの生体リズムと同様に、血圧日内リズムも体内時計の支配下にあることが解明されたが、血圧日内リズムの破綻がどのように高血圧症例の一部に起こるのかは分かっていない。近年、エネルギー代謝調節あるいは代謝リズムが、生体リズムに大きな影響を与えることが分かってきた。この事実から、我々は、血圧日内リズムも代謝リズムの変化によって影響を受ける

かもしれないと考えた。この仮説を証明するために、血圧日内リズムに異常をもつ本態性高血圧モデルラットの代謝リズムの解析を行った。その結果、このラットでは摂食リズムをはじめとして、代謝調節遺伝子の発現リズムなどのエネルギー代謝リズムにも異常をもつことを見出した。そ

して、摂食リズムの是正が、代謝リズムの一部、および血圧日内リズムを正常化することを発見した。以上の結果は、血圧日内リズムの制御においてエネルギー代謝リズムが重要な役割を果たしている可能性を示唆していた。