

第63回西日本生理学会

日時：平成24年10月19日（金）、20日（土）
場所：全労済ソレイユ3階 牡丹（大分県大分市中央町）
当番幹事：大分大学医学部神経生理学講座 横井 功
大分大学医学部病態生理学講座 小野克重
参加者数：63名
演題数：28題

第63回西日本生理学会は、全労済ソレイユ（大分市）にて、10月19日（金）、20日（土）の2日間にわたり開催された。63名の参加者、28題の口演発表（口演：10分、質疑応答：5分）で活発な討議が行われた。37歳以下の若手研究者を対象とした「日本生理学会九州奨励賞」には7題の応募があり、審査員による厳正な審査が行われ受賞演題（規定2題）を選考したところ、優秀な発表3題が最終選考に残った。当番幹事が会場の参加者より満場一致の了解を得て、今回は九州大学大学院・歯学府・全身管理歯科の齊郷平先生による「DAG活性化型TRPCチャンネルとPIP₂動態のキネティクス解析」、九州歯科大学・生理学分野の人見涼露先生による「口内炎ラットにおける酸および機械刺激に対する感受性亢進」、および、産業医科大学・医学部・第1生理学の大久保淳一先生による「ラット視索上核バゾプレッシンおよびオキシトシンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の検討」の3題を受賞とした。若手研究者のさらなる躍進に期待したい。1日目の学会終了後には恒例の懇親会が行われ、会員相互の親睦が深められた。2日目は一般演題の他に、パイロット企画として「学部学生セッション」と題し医学教育カリキュラムの中で講座等が研究指導をした学部学生による発表の場を設けた。4名の学生が口演発表を行ない、研究内容の理解、研究への主体的取り組み、卒後への期待、プレゼンテーション能力などを評価基準として4名の審査員による審査の結果、大分大学医学部医学科の藤田崇史君が最優秀賞を受賞した。評議員会および総会において、常任理事会の報告、次回、次々回の当番校の紹介、決定が行われた。次回の当番校である産業医科大学・医学部・第2生理学 井上真澄教授より、10月18日（金）、19日（土）に北九州市の産業医科大学ラマツイーニホールで開催される旨の案内があった。また、次々回当番校は琉球大学に決定した（医学部分子・細胞生理学講座 松下正之教授、医学部形態機能医科学講座 酒井哲郎教授）。

日本生理学会九州奨励賞審査対象演題

1. 肺がん脳転移におけるがん細胞・グリア細胞連関の解明

直江智子，山藤芽実，上土井太志，藤田慶大，秋元望，毛利優希，井口東郎，野田百美（九州大学大学院薬学研究院病態生理学分野）

近年、乳癌や肺癌の脳転移が増加しており、その対策が重要となってきている。がん細胞の生育には自身の特性に加えて、がん細胞をとりまく微小環境との相互作用も重要であり、脳内微小環境の研究も盛んになっている。当研究室ではこれまでに、グリア細胞と脳転移した肺がん細胞との連関において、アストロサイト、ミクログリアががん周

囲に集積し、アストロサイトはがん増殖を促進させていることを明らかにした。今回、新たにグリア細胞の肺がん細胞浸潤能への影響について検討を行った。その結果、アストロサイトは液性因子を介し肺がん細胞の遊走性を亢進させていることを認め、浸潤能を亢進させていることが示唆された。一方、ミクログリアは貪食作用により異物を排除する。がん細胞影響下でこの貪食能について検討したところ、肺がん細胞培養上清中ではミクログリアの貪食能は亢進していた。しかし、アストロサイト・肺がん細胞共培養上清ではこの亢進が認められず、アストロサイトはミクログリアの貪食能を制御することが示唆された。ミクログリア貪食を抑制すると報告される因子の一つにGDNF (Rocha et al., 2012)がある。アストロサイトからのGDNF放出

量を調べたところ、がん細胞影響下で増加していた。以上より、脳転移した肺がん細胞はグリア細胞と相互作用し、巧みにこれらの機能を制御することで、生育に適した微小環境を形成することが示唆された。

2. DAG 活性化型 TRPC チャンネルと PIP₂ 動態のキネティクス解析

齊 郷平^{1,2}, 森 誠之², 今井裕子¹, 岡村康司³, 安部喜八郎¹, 井上隆司² (¹九州大学大学院歯学府全身管理歯科, ²福岡大学医学部生理学, ³大阪大学大学院医学系研究科統合生理学)

TRPC3/C6/C7 (Transient Receptor Potential Classical) はホスホリパーゼ C の働きにより PIP₂ から産生されるジアシルグリセロール (DAG) によって活性化される非選択的カチオンチャンネルである。最近の研究から、これらのイオンチャンネルにとって PIP₂-DAG シグナルを介した、自己制御機構が働いている可能性を示した。しかしながら、生理的アゴニスト刺激下におけるチャンネル活性と自己制御機構の関連性については未だ不明である。そこで、パッチクランプ法にて TRPC 電流を、FRET 法にて PIP₂ の同時計測を行い、両者の変動について検討を加えることにした。その結果、受容体刺激 (ムスカリン性) において、チャンネルの活性化・不活性化と PIP₂ 減衰に正の相関があり、自己制御機構の重要性が明らかとなった。また、細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇をほとんどキレートしない、生理的条件下では、TRPC チャンネルは速い活性化、不活性化を伴った一過性電流、及びそれに続くプラトー相を生じる。この時、PIP₂ の動きは、一過性に減衰するだけでなく、明確なりカバリー相を示した。これらの測定結果を PIP₂-TRPC チャンネル間の解離定数を導入した自己制御機構モデルと比較したところ、高い相似性が得られた。これらは、チャンネル活性と PLC による PIP₂ の代謝が強く相関している結果と考えられた。

3. 糖尿病はエタノールにより増加したラット脳海馬セロトニン放出を低下させる

永田瑞生¹, 西山敦子², 平山隼人³, 仁後亮介³, 大和孝子^{2,3}, 青峰正裕^{2,3} (¹福岡医療短大・保健福祉, ²中村学園大・栄養科学, ³中村学園大院・栄養科学)

アルコールが糖尿病 (DM) ラットの脳海馬セロトニン (5-HT) 放出にどのような影響を及ぼすのかを調べるために、非糖尿病 (non-DM) ラットと比較検討した。5-HT の測定には in vivo microdialysis 法を用いた。エタノール (EtOH) を腹腔内投与および脳内灌流したところ、両投与方法ともに両群ラットで EtOH 濃度依存性に 5-HT 放出を増加したが、DM ラットにおいては non-DM ラットに比し

て増加の程度は低かった。しかし、両群ラットの血中 EtOH 濃度に有意な差はなかった。以降の実験は脳内灌流にて行った。まず 3 種のアルコール間での 5-HT 放出量を比較したところ、non-DM ラットでイソプロパノール, EtOH, メタノールの順に 5-HT 放出量は有意に増加したが、DM ラットではそのような差異はなかった。種々の 5-HT 受容体阻害薬・作動薬存在下での両群ラットの 5-HT 放出量を比較した場合、DM ラットでは 5-HT₃, 5-HT₄ 受容体阻害薬で non-DM ラットと比較して 5-HT 放出が有意に増加した。一方、EtOH の主要代謝産物であるアセトアルデヒドを灌流した場合、両群ラットともに EtOH と比較して 5-HT 放出は有意に増加した。以上より、糖尿病では 5-HT 受容体を含む中枢の神経伝達システムの異常を引き起こしている可能性ならびにアルコール脱水素酵素活性も低下している可能性が示唆された。

4. 実験的糖尿病ラットにおける脳海馬一酸化窒素とセロトニンの関係

平山隼人¹, 西山敦子², 松岡伴実², 仁後亮介¹, 大和孝子^{1,2}, 青峰正裕^{1,2} (¹中村学園大・院・栄養科学, ²中村学園大・栄養科学)

【目的・方法】糖尿病患者ではうつ病の合併頻度が高く、その原因の一つにモノアミン仮説が挙げられる。一方、一酸化窒素 (NO) が糖尿病の発症や合併症に関与しているという報告がある。そこで本研究では、NO 供与剤 SNP (0.01-1mM) や NOS 阻害剤 L-NMMA (0.01-1mM) を STZ 糖尿病ラットおよび健常ラットに作用させ、NOx (=NO₂⁻ + NO₃⁻) とモノアミンであるセロトニン (5-HT) を左右の脳海馬から脳微小透析法を用いて同時測定し、それらの関係を検討した。

【結果・考察】SNP を脳内灌流すると STZ ラットおよび健常ラットいずれにおいても脳海馬 NOx レベルを濃度依存性に上昇させた。特に、1mM において STZ ラットは健常ラットに比して 5 倍以上も NOx レベルが上昇した。しかし NOx レベルの上昇に伴い 5-HT レベルは減少する傾向がみられた。また、いずれのラットにおいても L-NMMA の脳内灌流で濃度依存性に NOx レベルが減少し、特に 1mM においては STZ ラットにおいては健常ラットよりも有意な NOx レベルの減少がみられた。5-HT レベルは NOx レベルの減少に伴い、健常ラットにおいて上昇傾向、STZ ラットにおいては減少傾向を示した。以上のことから、STZ ラット脳海馬では NOS 活性の上昇が示唆された。また、NOx レベルの増減によって 5-HT レベルが影響を受ける可能性が示唆された。

5. 漢方薬は蛙坐骨神経の複合活動電位を抑制する

松下晋大, 藤田亜美, 大坪瀬奈, 蔭 昌宇, 羅 清甜, 康 欽, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

我々は、以前、カプサイシン (唐辛子成分) やジンゲロン (生姜成分) のようなバニロイド化合物の TRPV1 作動薬およびメントール (ミント成分) やシネオール (ユーカリ成分) のような TRPM8 作動薬が TRP の活性化なしに活動電位の伝導を抑制することを明らかにしている。様々な植物由来成分を含む漢方薬が伝導抑制効果をもつことが期待されるが、この点はまだ検討されていない。本研究の目的は、漢方薬に伝導抑制作用があり、これに植物由来の TRP 作動薬が関与しているかどうかを知ることである。実験は、蛙坐骨神経に air-gap 法を適用し複合活動電位 (CAP) を記録することにより行った。大建中湯、立効散、桔梗湯、六君子湯および葛根湯はいずれも CAP を抑制し、その大きさは、2mg/ml の濃度で、それぞれ 70, 30, 25, 15, 12% であった。最も抑制効果の強い大建中湯 (IC₅₀ = 1.1 mg/ml) には、TRPV1 や TRPA1 の作動薬が含まれている。バニロイド構造を持たない TRPV1 作動薬ビベリン (黒胡椒成分) は 70mM で 20% だけ CAP 振幅を抑制し、TRPA1 作動薬のアリルイソチオシアネート (わさび成分) やシンナムアルデヒド (シナモン成分) は、それぞれ 1.4 mM と 1.2mM の IC₅₀ 値で CAP を抑制した。以上より、TRP 作動薬を含む漢方薬には活動電位の伝導抑制作用があることが示唆された。

6. 口内炎ラットにおける酸および機械刺激に対する感受性亢進

人見涼露, 小野堅太郎, 稲永清敏 (九州歯科大学生理学分野)

口内炎が発症すると、食事等の物理的な接触や味刺激などにより激痛が生じる。口内炎は、抗がん剤治療や放射線治療の副作用の一つでもあり、その疼痛の除去が早急に求められている。しかし、これまで口内炎による疼痛メカニズムに関する研究はほとんど行われていない。本研究では、ラットにおける口腔内の疼痛評価法を確立し、口内炎による口腔内の疼痛発症機構を解明することを目的として、ラットの下唇粘膜に酢酸を用いて口内炎を惹起させ、炎症部位の組織変化と機械および酸刺激に対する疼痛関連行動について検討した。覚醒下における安定した口腔粘膜露出のために、オトガイ部皮膚にリングを装着して下方へ牽引することによって、下唇粘膜への機械刺激を行った。口内炎 2 日目において粘膜上皮が剥離し、炎症性細胞が多く浸潤していた。口内炎部の機械的逃避閾値は、口内炎発症 2

日目以降において有意に低下した。この機械的アロディニアは、下顎粘膜へのキシロカイン塗布によって抑制された。さらに、炎症部位への酸溶液滴下によって、有意に疼痛関連行動が増加した。また、下顎粘膜深部組織へのフルオロゴールド (FG) 浸透性および三叉神経節での FG 陽性細胞数は、健常粘膜と比較して口内炎では増加していた。以上より、口内炎によって発症する機械的アロディニアおよび酸の感受性亢進には、組織炎症と上皮剥離による組織内への物質浸透性の増加が関与している可能性が示された。

7. ラット視索上核バゾプレッシンおよびオキシトシンの蛍光タンパク遺伝子導入による同定とカイニン酸応答の検討

大久保淳一^{1,2}, 大淵豊明², 大野素子¹, 丸山 崇¹, 松浦孝紀¹, 加藤明子^{1,2}, 吉村充弘¹, 石倉 透¹, 鈴木秀明², 上田陽一¹ (1産業医科大学・医・第1生理学, 2産業医科大学・医・耳鼻咽喉科学)

【背景と目的】視床下部の視索上核 (supraoptic nucleus : SON) には下垂体後葉ホルモンであるバゾプレッシン (arginine vasopressin : AVP) とオキシトシン (oxytocin : OXT) を産生する大細胞性神経分泌ニューロンの細胞体が局在し、その軸索を下垂体後葉に投射している。最近、蛍光タンパク遺伝子を導入したトランスジェニックラットを用いて、AVP および OXT を産生するニューロンを生細胞のまま同定することが可能となった。我々はこれまでに、カイニン酸 (kainic acid : KA) をラット皮下に投与することにより誘発されるけいれん発作後に SON の AVP 産生が増加することを明らかにした。今回、我々は電気生理学的手法を用いて KA の AVP ニューロンへの直接作用について OXT ニューロンと比較検討した。

【方法】実験には、幼若ウイスター系雄性の AVP-enhanced green fluorescent protein (eGFP) または OXT-monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP 1) トランスジェニックラットの SON を含む脳組織を酵素処理後、単離・培養したニューロンを用いた。蛍光顕微鏡下に AVP-eGFP ニューロンまたは OXT-mRFP1 ニューロンを緑色もしくは赤色蛍光を指標に同定した。ホールセルパッチクランプ法を用いて、KA を投与した場合の電気生理学的変化を記録、解析した。また、非 NMDA 受容体アンタゴニストである CNQX および選択的 GluK1 サブユニットアンタゴニストである UBP302 存在下での KA 応答の変化を調べた。

【結果】KA による内向き電流は OXT-mRFP1 ニューロンの方が AVP-eGFP ニューロンより有意に大きな電流が観察された。この電流の有意差は UBP302 存在下で消失し

た。

【結語】SONのAVP、OXTニューロンともに、KAにより内向き電流が生じた。

学部学生セッション演題

1. 脳由来神経栄養因子BDNFの心臓における発現と低酸素病態下での機能

藤田崇史、森島真幸、小野克重（大分大学・医学部・病態生理学講座）

【背景】脳由来神経栄養因子BDNFとその受容体TrkBは脳神経系だけでなく、心血管系にも発現が認められるが、心臓における機能は解明されていない。そこで我々は、心臓におけるBDNFの発現動態と低酸素刺激によるBDNF発現量の変化を解析した。【方法】新生ラット心筋細胞を単離培養し、低酸素刺激（1%O₂）によるBDNFの発現量と細胞の形態変化を観察した。さらに、週齢の異なるラットの脳（脳幹、海馬）と心臓（心房、心室）組織におけるBDNF及びTrkBの発現量を比較した。【結果・考察】BDNFは新生ラット心筋では心房筋と心室筋でほぼ同等に発現しており、脳幹及び海馬の発現のおおよそ50%程度の高発現量を示した。一方、BDNF受容体TrkBの心筋での発現は海馬と比べ、心房筋で約50%、心室筋で約30%であった。In Vitroでの低酸素刺激で心筋細胞のBDNF発現量は一時的に増加し（3h値、126±7%）、その後減少した（24h値、52±2%）。この一時的な発現変化は心筋細胞の自動拍動の一時的増加とその後の減少と連動しており、低酸素6時間以降は共に著しく減少した。以上の結果より、BDNF及びその受容体TrkBが心筋で高密度に発現し、その発現が病態下で調節を受けることを本研究は初めて明らかにした。

2. 高重力負荷によるラット一過性脳虚血が脳組織に及ぼす影響

中沢祐介^{1,2}、西田育弘¹（¹防衛医科大学校・生理学講座、²大分大学・医学部・神経生理学講座）

【背景】戦闘機操縦者は、頭部から足方向への強い重力加速度（+Gz）を受けることで、一過性脳虚血状態に陥る。これにより操縦者は意識消失や視野狭窄などを生じてしまう。この一過性脳虚血が脳組織に及ぼす影響について詳細に調べられた研究は少ない。【目的】高重力負荷により生じる一過性脳虚血が脳組織に与える影響を、脳損傷マーカーの一つであるS100Bに着目し検討する。【方法】SDウレタン麻酔下ラットを用い、脳虚血は小動物用加速度負荷装置で+Gzを負荷して再現した。負荷強度4G、負荷持続時間3minとし、頭部レベル血圧（APLB）、中心静脈圧（CVP）、

心拍数（HR）を測定した。その後、10匹のラットに対し負荷前、負荷1h、4h、6h後に採血を行い、血中S100B濃度をELISA法により測定した。【結果】負荷条件4Gにおいて3分間のAPLB、CVP、HRは2.8±7.0mmHg、-18.7±0.9mmHg、417.3±25.8bpm（mean±SD）を示した。負荷前と負荷1h、4h、6h後の血清S100B濃度をそれぞれ比較したところ、統計的有意差は見られなかった。【考察】血中のS100B濃度は、脳損傷、脳虚血再灌流モデルラットにおいて増加することが知られている。しかし、血中S100B濃度において経時的に有意な変動は見られなかった。よって、今回の負荷範囲では一過性脳虚血による明らかな脳細胞障害の所見は得られなかった。

3. アセチル-L-カルニチンによる神経保護作用のスピ解析による検討

島田真樹（大分大学・医学部・神経生理学講座）

カルニチンエステルであるAcetyl-L-carnitine（ALCAR）は、生体内に存在するグアニジノ化合物であり、副作用を避けて十分な量を投与することが可能といわれている。本実験では、灌流液にALCARを加えることによる脳虚血負荷後の回復を、核磁気共鳴法（NMR）および電子スピン共鳴法（ESR）を用いてエネルギー代謝および抗酸化作用の観点から検討した。【方法】³¹Pを観測核としたNMRを用いてラット脳スライス中のクレアチンリン酸（PCr）を経時的に測定し、定量した。脳虚血再灌流モデルは、64分間灌流を停止し、再び灌流を行うことで再現した。停止の間灌流液を、ACSFからACSFにALCARを添加（3mM）した溶液に切り替える群と対照群とで、負荷に対するALCARの脳保護効果をエネルギー代謝の側面から比較検討した。【結果】エネルギー代謝的にはALCARによる脳保護作用は認められなかった。ESRによる測定ではフリーラジカルに対する直接のscavenge能は見られなかったが、TBARSアッセイにより抗酸化作用が認められた。【考察】直接のラジカルスカベンジ能ではなく、間接的な抗酸化的機序で脳を保護していることが示唆される。

4. 水溶性αリボ酸による神経保護作用のスピ解析による検討

水谷有輝（大分大学・医学部・神経生理学講座）

【背景と目的】脳組織は虚血に対して非常に脆弱である。心肺停止蘇生後の脳虚血障害に対して脳低温療法などの方法があるが、効果は限定的であり、新たな治療方法の開発が求められている。本実験では、脳虚血一再灌流負荷に対して水溶性αリボ酸による脳保護効果を、スピ解析、すなわち核磁気共鳴法（NMR）および電子スピン共鳴法

(ESR)を用いて、エネルギー代謝および抗酸化作用の観点から検証する。【方法】ラット (Wistar系, ♂, 6週齢)の脳を用いて、脳の灌流を停止し、脳に一定時間(64分間)虚血負荷を与えた後に、再び灌流させた。虚血負荷中および再灌流による回復過程において、³¹P-NMRを用いてクレアチニンリン酸(PCr)の動態を測定した。また、ESRとTBARSアッセイで水溶性αリポ酸の抗酸化能をin vitroのモデルにおいて評価した。【結果】水溶性αリポ酸は濃度が上昇するごとに、PCrの回復は良好であった。ESRにおける水溶性αリポ酸のラジカルスカベンジ能は見られなかった。TBARSアッセイにおいては抗酸化作用が認められた。【考察】水溶性αリポ酸は濃度が上昇するごとに、脳の神経を保護していたと示唆される。ESRにおける水溶性αリポ酸の直接のラジカルスカベンジ能は認められなかったが、TBARSアッセイにおいては抗酸化能が見られた。

一般演題

1. 心筋PMCA近傍の[Ca]ⁱ分布の数値シミュレーション

塩谷孝夫(佐賀大学医学部生体構造機能学講座器官・細胞生理学分野)

【目的】これまでの実験結果から、心筋細胞膜のCa-ATPase (PMCA)が、局所的に[Ca]ⁱを低下させてNa/Ca exchanger (NCX)の活性を抑制的に調節することが示されている。本研究では、たかだか30個/秒程度とされるPMCAのCa輸送速度で、そのような局所[Ca]ⁱの低下が生じうるのか、数値シミュレーションによって検討した。

【方法】Linux上のGNU Octave数値計算ソフトウェアを用いて、Neher (1986)のdiffusible buffer仮定に基づいた数値シミュレーションを行い、PMCA分子近傍の[Ca]ⁱ分布について検討した。【結果】実験と同じ0.1mM-BAPTA存在下の条件で、30個/秒のCa輸送速度をもつPMCAがNCX分子の近傍に400nMの局所[Ca]ⁱ低下をもたらすには、PMCA分子とNCX分子の距離が50nm程度であれば十分であることが示された。【結論】このシミュレーション結果は、PMCAのCa輸送速度でも、実験的に観察されたNCX抑制に十分な大きさの局所[Ca]ⁱ低下が生じうることを示す。

2. 線維化促進因子TGF-β1下流における消化管筋線維芽細胞TRPC4,C6チャンネルの役割

倉原(海) 琳, 住吉美保, 井上隆司(福岡大学医学部生理学)

消化管筋線維芽細胞は病変部の創傷治癒に寄与し、この細胞による組織再構築の際に生じる瘢痕や歪みが腸管狭窄へ繋がる。腸管狭窄に対する内科的治療法は未だ見つかっていない。重要な線維化促進因子であるTGF-β1は狭窄部位で増加がみられ、筋線維芽細胞の分化・遊走・接着・細胞外マトリックスの構築に重要な役割を担う。本研究では線維化過程においてCa²⁺が果たす役割について検討を行った。

1%FBS/SmBM培地中でTGF-β1 (5ng/ml)で筋線維芽細胞株InMyoFibを刺激すると、αSMA, コラーゲンI, IIIなどの線維化マーカーの上昇に伴って、カチオンチャンネルTRPC4,C6のmRNA, タンパク発現が著しく上昇した。この結果を踏まえ、RNA干渉実験を行った。TRPC4,C6のsiRNAはTGFβ1によるCOL1A1, インターロイキンの発現増加を更に促進した。受容体活性化型カルシウム流入阻害剤SK&F96365をTGFβ1刺激の際に加えると、COL1A1やインターロイキンの発現に対してsiRNAと同じ作用が確認された。また、TRPC6はTGF-β1の下流にあるSmad2, p38-MAPK, Erk1/2のリン酸化に対しても、有意に抑制していることが分かった。しかし、αSMAの発現や遊走能に関してはTGF-β1の有無に関係なく、TRPC6の発現を抑制するとαSMAの発現減少や遊走能の増大が観察された。

TGF-β1線維化刺激に応答する筋線維芽細胞TRPC4, C6チャンネルは、Ca²⁺流入を介してTGF-β1の下流のシグナルに対して抑制的に働き、また細胞骨格αSMAの発現維持に関与している可能性が考えられる。これらの現象により消化管筋線維芽細胞による新しい線維化制御機構の可能性が示唆された。

3. TRPM4チャンネル発現増加による不整脈誘発機構の検討

胡 耀鵬, 段 玉斌, 倉原 琳, 市川 純, 井上隆司(福岡大学医学部生理学)

(背景・目的) TRPM4チャンネルは細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)上昇によって活性化される一価陽イオン透過型チャンネル(NSC_{Ca})で、心リモデリングなどの病的状態では不整脈を引き起こす要因となる可能性がある。しかしこれまで実験的に得られたCa感受性は極めて低かった(K_d>数百μM)。本研究では、ionomycinによるperforated cell-attached recording (Io-C/A)や電位依存性Caチャンネル(α_{1c}/β₂/α_{2δ})の共発現によって、細胞内環境をできるだけ擾乱しない条件下で、TRPM4チャンネルのCa感受性の再評価を行った。(結果)(1)上記の方法で得られたCa²⁺感受性(K_d値は約0.5μM)は従来の報告より極めて高く、心筋細胞

の生理的 $[Ca^{2+}]_i$ 変動範囲内にあった。(2) 心房筋細胞株 HL-1 をアンジオテンシン II (1 μ M) で4日間前処置すると、TRPM4 蛋白質の発現増加と TRPM4 様 NSC_{Ca} 電流の著明な増加が起こり、これと平行して、TRPM4 阻害薬 9-phenanthrol (50M) で抑制される自発的群発性活動電位 (AP) が観察された。(3) NSC_{Ca} を導入した Luo-Rudy dynamic ventricular model や Nygren atrial model にこれらの結果を当てはめると、TRPM4 チャネルの発現が増加した場合には、AP の延長や早期後脱分極 (EAD)、静止膜の脱分極が生じることが再現できた。(結論) 高い Ca^{2+} 感受性を有する TRPM4 チャネルの病的発現増加は、不整脈基質の形成に寄与し得ることが示唆された。

4. HCN2 過剰発現マウス心室筋のイソプロテレノール誘発自動能

大下健輔^{1,2}、井形幸代¹、栗原佳宏³、桑原宏一郎³、牛島一男²、鷹野 誠¹ (1久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門, 2久留米大学医学部麻酔学講, 3京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科)

過分極誘発陽イオンチャネル (HCN) は成人の心臓では刺激伝導系のみ存在するが、胎児では心室筋にも存在する。しかし、心肥大が生じた場合では成人の心室筋にも再発現し、不整脈の原因となる可能性が示唆されている。今回我々は心臓特異的に HCN2 を過剰発現したマウス (HCN2-Tg) の単離心筋を用い、心室筋の HCN2 発現と自動能発生との関係を whole cell patch clamp 法で検証した。生理的条件下では HCN2-Tg 心室筋細胞に自動能は認めなかった。そこで、isoproterenol (iso) を投与したところ、73% の細胞で自動能が出現した。自動能が発生しなかった細胞でも iso 投与により静止膜電位が有意に脱分極した (control, -71.3 ± 1.7 mV; iso, -68.6 ± 2.3 mV; $n=8$, $P=0.036$)。自動能の出現した HCN2-Tg は自動能が出現しなかったものより、HCN2 電流密度が大きい傾向を認めた。HCN2-Tg の iso 誘発自動能の発火頻度は 40~400bpm であった。自動能の発火頻度と HCN2 電流の密度との間には正の相関関係が示唆された。

5. パルミトイル化による HCN チャネルの機能制御

伊藤政之、鷹野 誠 (久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門)

パルミトイル化はタンパク質のシステイン残基にパルミチン酸が結合するタンパク質の翻訳後脂質修飾の一つであり、近年イオンチャネルの新たな制御機構として注目を浴びている。本研究では神経や心筋のペースメーカー細胞等の自発発火特性を制御する過分極誘発陽イオンチャネル

(HCN チャネル) がパルミトイル化によって制御を受ける可能性を検討した。初めに HCN チャネルに対するパルミトイル化阻害剤 2-Bromopalmitate (2BP) の効果を調べたところ、2BP 処理により HCN1, HCN2, HCN4 の電流が抑制されることが分かった。次に実際に HCN チャネルがパルミトイル化を受けているかどうか ABE (Acyl-biotinyl exchange) 法により生化学的に解析を行ったところ、HCN1, HCN2, HCN4 のパルミトイル化を検出することが出来た。更に HCN2 のパルミトイル化サイトを変異体解析により探索すると、N 末端細胞内領域に存在する 5 つのシステイン残基 (C63, C69, C82, C89, C104) がパルミトイル化を受けていることが分かった。以上の結果から、HCN チャネルが N 端部分にパルミトイル化を受け電流が増大することが明らかになったが、その機序について不明点も多い。今後、HCN チャネルの細胞膜への移行がパルミトイル化により促進されるのか、それとも他の機構によるものなのかどうか検証を続けたい。

6. Phosphorylation state determines calmodulin-induced activity of Cav1.2 Ca^{2+} channels

L.F. Yu^{1,2,3}, J.J. Xu¹, E. Minobe¹, L. Yang¹, A. Kameyama¹, K. Yazawa¹, L.Y. Hao³, M. Kameyama¹ (1Dept Physiol, Grad Sch Med & Dent Sci, Kagoshima Univ., 2Dept Basic Med, Clin Med Coll, 3Dept Pharmacol Toxicol, Sch Pharmacol Sci, China Med Univ, Shengyang, China)

Effects of phosphorylation on calmodulin (CaM)-induced activity of Cav1.2 channels were examined in guinea-pig ventricular myocytes. The responsiveness of Cav1.2 channels to CaM in excised patches subsided during the run-down period in a time-dependent manner. Application of PKA catalytic subunit (PKAc) or okadaic acid (OA, 1mM, an inhibitor of PP1 and PP2A) with MgATP maintained this responsiveness of the channels in the run-down state. However, inhibition of PP2B had no effect. Surprisingly, cAMP + MgATP mimicked the PKAc effect, implying that inactive PKA was still on or near the channel in the inside-out patches. These results suggest that both phosphorylation and CaM interaction are required for basal activity of Cav1.2 channels.

7. ラットの水および塩分摂取行動に対するエタノール作用

稲永清敏¹、神田修治¹、近藤智裕¹、田中慶太¹、山口高広¹、氏原 泉^{1,2}、人見涼露¹、小野野太郎¹ (1九州歯科大

学生理学分野,²九州歯科大学摂食機能リハビリテーション学分野)

二日酔いでは頭痛, 嘔吐, 胸のむかつき, 体の震えなどがおこる。口渇感も症状の一つである。エタノールによる利尿作用が主な原因であると考えられているが, そのメカニズムは充分には判っていない。ウイスター系雄性ラットを用い, 二瓶選択法による水および NaCl (0.3M) 摂取実験, c-Fos 免疫組織化学実験, スライス標本を用いた電気生理学的実験を行った。エタノール (2.5g/kg) 単独腹腔内投与, あるいはエタノールとシアナミド (10mg/kg) の併用投与により, コントロール (生理食塩水注入) と比べ, 有意な飲水量の増加が観察された。エタノール単独投与よりシアナミドとの併用投与の方が飲水量は多かった。このことは, エタノールの分解産物であるアセトアルデヒドが飲水行動に関与している事を示唆している。NaCl 摂取量は有意ではなかったが, 水分摂取と同じように増加した。また, エタノールあるいは, エタノール+シアナミド併用投与後, 水分摂取および塩分摂取行動に関与した脳神経核である脳弓下器官, 終板器官, 室傍核および視索上核での c-Fos 陽性細胞の数がコントロールに比べ有意に増加した。さらに, スライス実験で, エタノールは脳弓下器官ニューロンを主に興奮させ, アセトアルデヒドは主に抑制することが判った。以上のことから, エタノールおよびアセトアルデヒドが直接あるいは間接的に水分や塩分摂取に関連した脳神経核に作用し, 摂取行動を調節している可能性が示唆された。

8. ラット視交叉上核におけるアルギニンバゾプレッシン-改変緑色蛍光タンパク融合遺伝子発現の日内変動と電気生理学的特性の検討

丸山 崇, 大久保淳一, 吉村充弘, 松浦孝紀, 大野素子, 石倉 透, 上田陽一 (産業医科大学医学部第1生理学)

視床下部視交叉上核 (SCN) には種々の時計遺伝子が発現し生体リズムの中核であることが知られている。また, SCN の背内側部にはアルギニンバゾプレッシン (AVP) ニューロンが存在し, SCN からの主要な出力経路の一つであると考えられている。今回我々は, 当教室で作出した AVP-改変緑色蛍光タンパク (eGFP) トランスジェニックラットを用いて, SCN における AVP-eGFP 融合遺伝子および AVP 遺伝子発現 (AVP-eGFP mRNA, AVP mRNA, AVP hnRNA), 時計遺伝子発現 (Per1 mRNA, Per2 mRNA) および AVP-eGFP 蛍光の日内変動を検討した。さらに, 光刺激後のこれらの遺伝子の発現変化を観察した。また, SCN における AVP 産生ニューロンを eGFP 蛍光により同定し, 電気生理学的特性についても検討した。結果

としては, SCN における各遺伝子発現は日内変動を示し, 特に AVP-eGFP mRNA は顕著に反応していた。光刺激によっても各遺伝子の発現に変化がみられた。eGFP 蛍光については明らかな日内変動は観察できなかった。急性単離した AVP-eGFP 産生ニューロンの自発性活動電位を記録することができた。以上より, AVP-eGFP トランスジェニックラットは, 生体リズムの中核である SCN において, 生体リズムの研究を行う上で有用な実験モデルであると考えられる。

9. パーキンソン病モデルマウスにおける水素水の新しい作用機序

山藤芽実¹, 藤田慶大¹, 小島佑一郎¹, 松本明郎², 中別府雄作³, 野田百美¹ (¹九州大院・薬・病態生理学分野, ²千葉大院・医・薬理学分野, ³九州大生体医学防御研究所・脳機能制御学分野)

近年, 水素ガスが虚血再灌流障害に有用であり, また, 活性酸素種の中で最も細胞障害性を持つヒドロキシルラジカルを選択的に除去することが報告された。この報告以降, 様々な酸化ストレス疾患に対して水素分子が有用であることが次々に報告されている。

我々は, 以前, 水素ガスを含む飲用水 (水素水) が MPTP 誘発性パーキンソン病モデルマウスにおいて, ドパミン神経保護効果を示すことを明らかにした。水素水の神経保護効果は飲用期間に依存し, 飲用を中止しても, 数日間神経保護効果が残っていた。そこで, 脳内の水素濃度を測定したところ, 水素ガスの吸入では上昇したものの, 水素水の飲用では上昇しなかった。これより, 水素水飲用による神経保護効果は水素分子の直接的な抗酸化作用だけでは説明できないことが示唆された。

現在, 水素による神経保護作用の仲介役として, 神経保護作用が報告されている消化管ホルモン・グレリンに着目している。水素水をマウスに強制飲用させたところ, 胃におけるグレリン産生増加が観察された。そこで, グレリン受容体の阻害薬を水素水の飲用期間中に投与したところ, 神経保護作用が消失されており, グレリンが重要な役割を担っていることが示唆された。今回の報告は, 水素水飲用による消化管-神経系連関の可能性を示す, 初めての報告である。今後は, 水素水飲用により産生されたグレリンの詳細な神経保護作用機構について検討を行っていく予定である。

10. アロマ精油成分による蛙坐骨神経の複合活動電位の抑制

大坪瀬奈, 川崎弘貴, 藤田亜美, 松下晋大, 蔭 昌宇,

羅 清甜, 康 欽, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

我々は、以前、カプサイシンやメントールのような TRP チャネル作動薬の関連物質が、そのチャネルと無関係に活動電位の伝導抑制作用を持つことを明らかにしている。それらの多くは植物由来成分であった。今回、植物由来のアロマ精油成分のどんな化学構造が伝導抑制に重要であるかを知るために、様々な種類のアロマ精油成分が活動電位の伝導に及ぼす効果を調べた。実験は、蛙坐骨神経に air-gap 法を適用し、複合活動電位 (CAP) を記録することにより行った。メントールの6員環が開いたテトラヒドロラバンズロールは濃度依存性に CAP 振幅を減少させ ($IC_{50}=0.40$ mM), この値は以前報告したフェノール類のアロマ精油成分の作用と同程度であった。そのため環構造をもたないアロマ精油成分の作用に注目した。その結果、アルデヒド類のシトラールとシトロネラール, アルコール類のゲラニオールとシトロネロールは、それぞれ 0.48mM, 0.50mM, 0.53mM, 0.38mM の IC_{50} 値で CAP 振幅を減少させることがわかった。以前報告した結果を考え合わせると、アロマ精油成分による CAP 抑制の序列は、フェノール類=アルデヒド類 \geq アルコール類>ケトン類>オキサイド類>炭化水素鎖であった。アロマ精油成分の特異的な化学構造が伝導抑制に重要であることが明らかになった。

11. 成熟ラット脊髄後角膠様質ニューロンにおける自発性の興奮性および抑制性のシナプス伝達に及ぼすオキシトシンの作用

蔣 昌宇, 藤田亜美, 羅 清甜, 康 欽, 松下晋大, 大坪瀬奈, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

オキシトシンは脊髄後角において痛み伝達の制御に働くことが知られているが、その作用機序は十分に調べられていない。成熟ラットから脊髄横断薄切片を作製し、痛みの制御に重要な役割を果たす後角第 II 層 (膠様質) ニューロンにパッチクランプ法を適用し、オキシトシンが興奮性および抑制性のシナプス伝達に及ぼす作用を調べた。-70 mV でオキシトシンは内向き膜電流 (脱分極) を生じる一方、自発性興奮性シナプス伝達に影響しなかった。この作用は濃度依存性で ($EC_{50}=0.022$ mM), 繰り返し見られ、電位作動性 Na^+ チャネル阻害薬テトロドトキシン, AMPA 受容体阻害薬 CNQX および無 Ca^{2+} 溶液により影響を受けなかった。この応答は内因性鎮痛物質が膜を過分極するニューロンでも見られた。一方、GABA やグリシンを介する自発性抑制性シナプス後電流の発生頻度は、オキシトシンにより濃度依存性に増加した (それぞれ EC_{50} は、0.024

mM と 0.038mM)。この作用は繰り返し見られ、テトロドトキシン存在下で消失した。以上のオキシトシン作用は、いずれもオキシトシン受容体作動薬でも見られる一方、オキシトシン受容体阻害薬の存在下で消失した。以上より、オキシトシンは、その受容体活性化により膜脱分極と抑制性シナプス伝達の促進を起こすことが明らかになった。これらの作用はオキシトシンによる痛み伝達制御に働くことが示唆される。

12. シネオールは成熟ラット脊髄後角膠様質ニューロンの自発性興奮性シナプス伝達を促進する

徐 年香, 藤田亜美, 蔣 昌宇, 羅 清甜, 康 欽, 松下晋大, 大坪瀬奈, 熊本栄一 (佐賀大学医学部生体構造機能学講座神経生理学分野)

我々は、今まで、後根神経節ニューロンの中枢端に発現している TRP チャネルの活性化は脊髄膠様質ニューロンへの自発性グルタミン酸放出を促進させることを明らかにしている。今回、ユーカリなどの植物の精油に含まれる 1,8-および 1,4-シネオールが膠様質ニューロンにおけるグルタミン酸作動性の自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を調べた。実験は、成熟ラット脊髄横断薄切片の膠様質ニューロンへホールセル・パッチクランプ法を適用することにより行った。1,8-シネオールは可逆的および濃度依存的に自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) の発生頻度を増加させ、その EC_{50} 値は 2.7mM であった。一方、sEPSC の振幅は影響を受けなかった。この増加作用は、TRPV1 チャネル阻害薬カプサゼピンにより影響を受けなかった一方、TRPA1 チャネル阻害薬 HC-030031 により抑制された。1,4-シネオールも sEPSC の発生頻度を増加させたが、この作用は 1,8-シネオールの作用よりずっと大きかった ($EC_{50}=0.18$ mM)。この 1,4-シネオール作用も、カプサゼピンにより影響を受けなかったが、HC-030031 により抑制された。以上より、1,8-および 1,4-シネオールは後根神経節ニューロンの中枢端に発現している TRPA1 チャネルを活性化して膠様質ニューロンへのグルタミン酸の自発放出を促進すると結論した。

13. カエル心臓八木式灌流法の研究

穎原嗣尚, 坂元 駿, 浦川勇哉 (長崎国際大学薬学部生理学研究室)

伝統的な生理学実習項目であるカエル心臓の八木式灌流法を改良して心拍動をより定量的に観察記録できるようにした。すなわち①心室の収縮 (縮小)・弛緩 (拡大) を気圧変化に変換して捉える簡便な装置 (連通標本槽) を考案し、圧変化を拍出量の指標として連続描記できるようにした。

測定原理：太い U 字型連通管（内径約 2.5cm）を垂直に立ててリンガー液を入れ、連通管側のリンガー液に八木式灌流標本の心室部を浸す。すると心室の拍出（心室の体積減少）とともに両側連通管の液面が下降し、その下降の程度は拍出量が多いほど大である。心室が拡張すると液面は上昇する。標本の無い方の連通管の上部空間を気密にしておくと液面の昇降にともなって空間内気圧が上下するので、それを圧センサーを用いて記録する。②灌流装置静脈側の灌流液貯留槽を改良した。還流抵抗を減らすために太い管（内径約 2.4mm）を用いて静脈カニューレを作製し、これを貯留槽（20ml 用デイスボ注射筒を加工して作製）の側壁に水平に接続した。水平にすることにより心室前負荷を最小約 1cmH₂O まで小さくできる。③後負荷を増やせるように動脈カニューレを上方に延長できるようにした。このように改良したウシガエル心臓八木式灌流実験によって、心室前負荷を増減（1-5cmH₂O）したときの心拍出量の劇的な変化、さらには後負荷の増減（7-30cmH₂O）や心拍数増減の心室動態に及ぼす影響などを明確にまた安定して観察描記することができた。この実験方法は、血液循環の安定化に寄与する心臓の力学的特性を理解するために大変有用である。

14. モルモット副腎髄質細胞の GABA_A 受容体の性質

井上真澄, 原田景太, 松岡秀忠（産業医科大学医学部第 2 生理学講座）

GABA は副腎髄質（AM）細胞においてパラクリンとして機能していることが考えられている。そこで、モルモット AM 細胞における GABA_A 受容体の性質を電気生理学的及び生化学的に検討した。GABA 誘発性電流は、Za イオンにより用量依存的に抑制され、その IC₅₀ は 18μM であった。一方、10μM La イオンは全く影響を及ぼさなかった。Benzodiazepine analogs の diazepam 及び L838,417 は、GABA 誘発性電流を増加した。副腎皮質細胞から分泌される allopregnanolone は 0.01μM で有意に GABA 誘発性電流を増加させた。0.1μM allopregnanolone 存在下で GABA 誘発電流の用量反応関係は、最大値は変わらずに低濃度側にシフトし、0.1μM GABA によっても有意にチャネル活性が促進された。これらの薬理的性質は、モルモット AM 細胞の GABA_A 受容体の主なサブユニット構成が αβγ であること、α の主な isoform は α1 でなく、α2 または α3 であることを示唆する。実際イムノプロットにより主に α3 が発現していることが確認され、さらに α3 様免疫反応物は細胞辺縁及び核周辺に局在していた。副腎皮質から分泌される allopregnanolone は、AM 細胞における GABA のパラクリンとしての機能を促進していることが考えられる。

15. モルモット精囊の収縮特性に対する内膜の影響

武谷三恵¹, 林 篤正², 中村桂一郎³, 鷹野 誠¹（¹久留米大学医学部生理学講座統合自律機能部門, ²久留米大学医学部泌尿器科学講座, ³久留米大学医学部解剖学講座顕微解剖・生体形成部門）

精囊の収縮制御機構については、神経活動を介した経路以外ほとんど知られていない。これまでに我々は精囊内圧の測定から、精囊には神経活動に依存しない伸展刺激応答性の収縮機構が存在することを報告した。そこで今回は、モルモット精囊から反転リング状標本を作成して等尺性収縮張力を測定し、その詳細なメカニズムを検討した。

まず射精管開口側から盲端側の様々な部位から精囊反転リング状標本を作成したところ、全ての部位において伸展刺激応答性の収縮が認められた。しかしながら、内膜を剥離除去した標本では伸展応答性の収縮は全く発生しなかった。この内膜除去標本にノルアドレナリン（NA）を灌流投与したところ、濃度依存性に筋トーンを増加させると共に、振動性の収縮が発生した。筋トーンに対する NA の 50% 有効濃度は、内膜除去により 12μM から 4μM へと変化し、有意に NA 感受性が上昇することが判明した。また 90μM NA による最大トーンも、内膜除去により有意に増加した。一方、NOS 阻害薬である L-NAME および NO スカベンジャーの C-PTIO は、いずれも内膜保存標本の NA 誘発性収縮には全く影響を与えなかった。

以上より、精囊の内膜は (1) 伸展刺激の感知機構と、(2) NA 誘発性収縮を抑制的に調節する機構を有することが明らかになった。この機構には NO 以外の未知の分子が関与していることが示唆された。

16. Double Product (DP) を中心血圧, Augmentation Index (AI) によって評価する意義

今永一成^{1,2}, 原 寛²（¹福岡大学名誉教授, ²原土井病院）

DP は収縮期血圧と脈拍数の積で表され心負荷評価の一つとして用いられている。DP が基準値（急上昇変曲点）より大きいとき心負荷亢進と評価される。従来、収縮期血圧として「間接法による上腕血圧」が用いられている。しかし、心負荷を評価するには、血管反射波成分を反映する中心血圧或は AI を用いる意義は大きい。今回、運動負荷前後の上腕血圧を用いた DP（DP-bP）と中心血圧を用いた DP（DP-cP）とを AI を加味し比較検討した。[方法] 対象：健常若年者（24 歳）、高血圧若年者（36 歳）、健常高齢者（75 歳）。安静時及び運動負荷（VO₂max.20~50）直後に DP 測定。運動負荷：同一固体、毎日 2 回、同時刻、5 日試行。中心血圧、AI 計測：OMRON HEM-9000AI。DP の基準

値：13000（上腕収縮期血圧を用いた従来のもの）。[結果] 健常若年者、健常高齢者では、安静時には DP-bP>DP-cP で、いずれも基準値より低かった。運動 (VO₂max50) 後、DP-bP が基準値を超えても、DP-cP は基準値以下であった。AI は両者とも運動前後差なく低値(安全域)であった。高血圧若年者では安静時には DP-bPI<DP-cPI であり共に基準値以下であったが AI は共に高値(危険域)を示した。運動 (VO₂max30) 後 DP は共に基準値を超え DP-bP<<DP-cP を示した。運動後 AI はさらに高値(安静時に比べ有意)(危険域)を示した。[結論] DP は上腕血圧よりも中心血圧及び AI で評価することが意義であるものと考えられる。

17. 低酸素微小環境下でのミトコンドリア膜電位維持機構

高橋英嗣（佐賀大学大学院工学系研究科先端融合工学専攻）

固形がんの中心部には顕著な低酸素領域（低酸素微小環境）が形成される。培養細胞（Hep3B および COS-7）を用

いた2次元低酸素微小環境モデル（Takahashi and Sato, Am J Physiol, 2010）においてミトコンドリア膜電位を電位依存性蛍光色素 TMRM にて画像化したところ、酸素供給部から>500μm 離れた細胞で TMRM 蛍光が消失した。過去に発表した GFP を用いた細胞の酸素イメージングの結果（Takahashi *et al.*, Am J Physiol, 2006）と合わせて、上記 TMRM 蛍光喪失は、拡散性酸素供給の限界とそれに伴うミトコンドリア膜電位喪失を意味するものと考え、この限界点を anoxic front (AF) と名付けた。一方、プロリン水酸化酵素の非特異的ブロックである dimethylolxalylglycine (DMOG) を用い転写因子 HIF-1α を誘導したところ、AF は約 2~3 倍に増加し、本来の酸素の拡散限界点を越えてもミトコンドリア膜電位が維持され得る事がわかった。さらに、この効果は、ミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II のブロックである thenoyltrifluoroacetone で消失した事から、DMOG 投与時には、ミトコンドリア複合体 II が酸素非依存性に電子伝達および膜電位の形成に寄与していると考えた。